



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**Η συνεργιστική δράση του miR-140 και miR-146a σε οστεοαρθρικούς ιστούς.**

**ΚΑΤΣΙΩΤΗ ΕΛΕΥΘΕΡΙΑ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

ΑΣΠΑΣΙΑ ΤΣΕΖΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Επιβλέπουσα)

ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ, ΕΠΙΚΟΥΡΗ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΚΥΤΤΑΡΙΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Μέλος  
Τριμελούς Επιτροπής)

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ ΠΑΝ/ΜΙΟΥ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ (Μέλος  
Τριμελούς Επιτροπής)

**ΛΑΡΙΣΑ, 2018**



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**



**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ**

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**Synergistic role of miR-140 and miR-146a in osteoarthritic  
tissues**

**KATSIOTI ELEFThERIA**

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>7</b>
<b>A. ΚΥΡΙΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>9</b>
A.1 Δομή και λειτουργία αρθρικού χόνδρου.....	10
A.2 Στιβάδες αρθρικού χόνδρου.....	13
A.3 Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις.....	14
A.4 Οστεοαρθρίτιδα.....	17
A.5 Επιδημιολογία της OA.....	19
A.6 Πολλαπλοί φαινότυποι στην OA. Σύστημα ταξινόμησης K/L.....	20
A.7 Παράγοντες κινδύνου.....	21
A.8 Ο αρθρικός χόνδρος στην OA.....	23
A.9 Ο αρθρικός υμένας στην OA.....	25
A.10 Επιγενετική στην OA.....	26
A.11 Βιογένεση των miRNAs.....	28
A.12 Τρόπος δράσης των miRNAs.Μερική και πλήρης συμπληρωματικότητα....	29
A.13 miRNAs και OA.....	30
A.14 miR-140 και OA.....	32
A.15 miR-146a και OA.....	33
A.16 Σκοπός της εργασίας.....	35
<b>B.ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....</b>	<b>36</b>
B.1 Υλικά και μέθοδοι.....	37
<b>B.2 Αποτελέσματα.....</b>	<b>48</b>
<b>B.3 Συζήτηση.....</b>	<b>56</b>

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η οστεοαρθρίτιδα (ΟΑ) αποτελεί μια χρόνια εκφυλιστική πάθηση των αρθρώσεων, η οποία σχετίζεται με την προχωρημένη ηλικία, εμφανίζει εθνικές και γεωγραφικές διαφορές στο πρότυπο εμφάνισης της. Η ΟΑ οδηγεί σε απώλεια κινητικότητας και λειτουργίας των αρθρώσεων ενώ συνοδεύεται από χρόνια πόνο, φλεγμονή, πάχυνση του υποχόνδριου οστού και σχηματισμό οστεόφυτων. Κύριο χαρακτηριστικό της νόσου θεωρείται ο εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου μέσω διαταραχής των συστατικών της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας. Η καταβολική αυτή διεργασία υποκινείται από τα χονδροκύτταρα, τα οποία αποτελούν μοναδικό κυτταρικό τύπο στον αρθρικό χόνδρο. Τα αρθρικά χονδροκύτταρα αποτελούν μόνο το 2-3% του συνολικού όγκου του αρθρικού χόνδρου, ωστόσο κατέχουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της νόσου καθώς συνθέτουν τα δομικά συστατικά της ECM, και καταβολικά ένζυμα.

Μελέτες έχουν δείξει ότι στην διατήρηση της φυσιολογικής ανάπτυξης του χόνδρου συμβάλλουν τα (miRNAs), μια οικογένεια μικρών μη κωδικών μορίων RNA, μεγέθους 20-25 νουκλεοτιδίων, τα οποία δρουν ως σημαντικός ρυθμιστής της γονιδιακής έκφρασης, ειδικά στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Συγκεκριμένα, μέσω επιγενετικής τροποποίησης αποσιωπούν την έκφραση γονιδίων στοχεύοντας κυρίως στην 3' αμετάφραστη περιοχή του mRNA στόχου τους. Τα miRNAs εμπλέκονται στον έλεγχο διαφόρων κυτταρικών διαδικασιών και συμμετέχουν στην ανάπτυξη διαφόρων ασθενειών. Μελέτες έχουν δείξει ότι, πολλά miRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της χονδρογένεσης και της αναδιαμόρφωσης του χόνδρου, γεγονός που φανερώνει ότι η διαταραχή του προφίλ έκφρασης τους σχετίζεται με την παθογένεια της ΟΑ.

Το miR-140 είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής της διαφοροποίησης των χονδροκυττάρων, της ανάπτυξης του οστού και της ομοιόστασης της άρθρωσης. Ορισμένα από τα γονίδια-στόχοι του miR-140 είναι τα ένζυμα καταβολισμού MMP-13, ADAMTS-5 και ο παράγοντας IGFBP-5.

Στην ανάπτυξη και την εξέλιξη της οστεοαρθρίτιδας συμμετέχει επίσης και το miR-146a, το οποίο φαίνεται ότι υπερεκφράζεται στα αρχικά στάδια της ΟΑ. Η υπερέκφρασή του έχει συσχετισθεί τόσο με την απόπτωση των χονδροκυττάρων και την δημιουργία φλεγμονής στην άρθρωση αλλά και με την προστασία του αρθρικού χόνδρου από τον εκφυλισμό. Όμως, ο ακριβής ρόλος του miR-146 στην ΟΑ δεν έχει γίνει πλήρως κατανοητός.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη του συνεργιστικού ρόλου των miR-140 και miR-146a στην αιτιοπαθογένεια της ΟΑ. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκε η έκφραση των miR-140 και miR-146a σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα και κύτταρα υμένα, πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων-στόχων του miR-140 και miR-146a αλλά των σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν τα γονίδια-στόχοι και διερευνήθηκε ο ρόλος των miR-140 και miR-146a στη ρύθμιση της έκφρασης γονιδίων-στόχων τους (TLR-4, IRAK-1 και TRAF-6) αλλά και γονιδίων που ενέχονται στην αιτιοπαθογένεια της ΟΑ (ADAMTS-5, MMP-13, IL-6, IL-1 $\beta$  και TNF $\alpha$ ) μετά από χορήγηση miR-140 ή/και miR-146a σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων και κυττάρων αρθρικού υμένα.

Αρχικά προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των miRNAs, του σε ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα και σε κύτταρα υμένα, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος τους στην αιτιοπαθογένεια της νόσου. Στα ΟΑ χονδροκύτταρα παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του miR-140 και του miR-146a σε σχέση με τα φυσιολογικά, ενώ στα κύτταρα του οστεοαρθρικού υμένα σημειώθηκε μείωση της έκφρασης μόνο στο miR-146a σε σχέση με τα φυσιολογικά.

Από την βιοπληροφορική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα δύο miRNAs ρυθμίζουν την έκφραση μορίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TLR-4, το οποίο ενέχεται στην αιτιοπαθογένεια της νόσου. Συγκεκριμένα το miR-140 ρυθμίζει την έκφραση του TLR-4 και το miR-146a την έκφραση των γονιδίων IRAK-1 και TRAF-6. Επιπλέον το miR-140 ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου ADAMTS-5, ενός πρωτεολυτικού ενζύμου που διαδραματίζει κύριο ρόλο στην αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας του αρθρικού χόνδρου.

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της βιοπληροφορικής ανάλυσης μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων TLR-4 και ADAMTS-5 μετά από χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων miR-140 mimic σε ΟΑ χονδροκύτταρα. Παρατηρήθηκε, στατιστικά σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων της ADAMTS-5 στα ΟΑ χονδροκύτταρα που υπέστησαν επίδραση με miR-140, συγκριτικά με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε miR-140. Όσον αφορά την έκφραση του TLR-4 παρατηρήθηκε μείωση των μεταγραφικών του επιπέδων στα ΟΑ χονδροκύτταρα που υπέστησαν επίδραση miR-140 mimic, συγκριτικά με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε miR-140.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων IRAK-1 και TRAF-6 σε κύτταρα οστεοαρθρικού υμένα και από τα

αποτελέσματα προέκυψε στατιστικά σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων της IRAK-1 και TRAF-6 στα κύτταρα OA υμένα που υπέστησαν επίδραση με miR-146a mimic, συγκριτικά με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε.

Επίσης μελετήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων ADAMTS-5, MMP-13, IL-6, IL-1 $\beta$  και TNF- $\alpha$  μετά από χορήγηση miR-140 ή miR-146a mimic αλλά και μετά από ταυτόχρονη συγχορήγηση miR-140 και miR-146a mimic σε OA χονδροκύτταρα και κύτταρα οστεοαρθρικού υμένα. Παρατηρήθηκε σημαντική μείωση στα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων ADAMTS-5 και MMP-13 τόσο σε OA χονδροκύτταρα όσο και σε κύτταρα υμένα μετά τη χορήγηση miR-140mimic, με περαιτέρω μείωση των ανωτέρω γονιδίων να παρατηρείται μόνο στα OA χονδροκύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε συγχορήγηση με miR-146a mimic. Τα mRNA επίπεδα των φλεγμονωδών παραγόντων, IL-1 $\beta$ , IL-6 και TNF $\alpha$  μειώθηκαν στα OA χονδροκύτταρα και στα κύτταρα υμένα μετά τη χορήγηση miR-146a mimic. Η συγχορήγηση miR-140 και miR-146a mimiceπέφερε πρόσθετη μείωση στα μεταγραφικά επίπεδα της IL-6 στα OA χονδροκύτταρα και στα κύτταρα οστεοαρθρικού υμένα, ενώ τα mRNA επίπεδα της IL-1 $\beta$  μειώθηκαν μόνο στα κύτταρα OA υμένα.

## ABSTRACT

Osteoarthritis (OA) is a degenerative joint disease characterized by degradation of articular cartilage, thickening of subchondral bone, and formation of osteophytes. The etiology of OA is complex, with the contribution of genetic, developmental, biochemical, and biomechanical factors. Chondrocytes are the only cells in cartilage and are responsible for the synthesis and turnover of extracellular matrix (ECM), which is crucial to tissue function. MicroRNAs (miRNAs) are a novel group of universally present small non-coding RNAs, approximately 22–28 nucleotides in length, which regulate gene expression at the post-transcriptional level through mRNA degradation or translational repression. Each miRNA can regulate a large number of genes by binding mainly to the 3'UTR of mRNA targets. Recent studies have implicated miRNAs as promising clinical biomarkers in various diseases including cancer, diabetes, and cardiovascular disease. MiRNAs have also been associated with processes involved in OA pathogenesis, such as cartilage homeostasis, extracellular matrix regulation, endochondral ossification, bone metabolism, apoptosis, autophagy, inflammation, and lipid metabolism.

miR-140 is considered as a regulator of chondrocyte differentiation, bone development, and cartilage homeostasis. It has been demonstrated that a reduced expression of this miRNA in OA cartilage influences the expression levels of its target genes MMP-13, ADAMTS-5, and IGFBP-5.

In addition, miR-146a seems to be over-expressed in low-grade OA cartilage, suggesting the potential role of miR-146a in OA pathogenesis. However the exact role of miR-146a in OA pathogenesis remains unclear.

The aim of the present study was to investigate the synergistic role of miR-140 and miR-146a in OA pathogenesis. For this purpose the expression of miR-140 and miR-146a was determined in normal and OA chondrocytes as well as synovial cells, bioinformatic analysis was conducted in order to identify the target genes of miR-140 and miR-146a and also the signaling pathways they participate. In addition the role of miR-140 and miR-146a in the regulation of the expression of their target genes (TLR-4, IRAK-1 και TRAF-6) was investigated. Furthermore, the expression of genes that participate in OA pathology (ADAMTS-5, MMP-13, IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$ ) was determined after treatment with miR-140 and/or miR-146a (or both miRNAs) in OA chondrocytes and synovial cells.

Results showed that OA chondrocytes exhibited reduced expression of miR-140 and miR-146 in comparison with the normal cells, while in OA synovial cells only the expression of miR-146a was reduced compared to normal synovial cells. The results of the bioinformatic analysis depicted that the two miRNAs regulate the expression of molecules that participate in the signaling pathway of TLR-4, which is involved in the OA pathology. In particular, miR-140 regulates the expression of TLR-4 and miR-146a regulates the expression of IRAK-1 and TRAF-6 genes. Moreover, miR-140 regulates the expression of ADAMTS-5, a proteolytic enzyme with a key role in the degradation of articular cartilage ECM.

To confirm the results of the bioinformatic analysis, the expression of TLR-4 and ADAMTS-5 was evaluated after treatment with augmenting concentrations of miR-140 mimic in OA chondrocytes.

Statistical significant reduction was found at the transcriptional levels of ADAMTS-5 in OA chondrocytes treated with miR-140, compared to untreated. Also reduction at the expressional levels of TLR-4 was found in OA chondrocytes treated with miR-140 mimic, compared to untreated.

The same procedure was followed for the study of the expression levels of IRAK-1 and TRAF-6 in OA synovial cells. The results depicted a statistical significant reduction at the transcriptional levels of IRAK-1 and TRAF-6 in OA synovial cells treated with miR-146a mimic, compared to untreated.

On the transcriptional levels of ADAMTS-5, MMP-13, IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF $\alpha$  were evaluated after treatment with miR-140 or miR-146a mimic or both miRNAs at the same time in OA chondrocytes and synovial cells.

A significant reduction was found at the transcriptional levels of ADAMTS-5 and MMP-13 both in OA chondrocytes and in synovial cells after treatment with miR-140 mimic, with further reduction of the above genes being observed only in OA chondrocytes treated with miR-146a mimic.

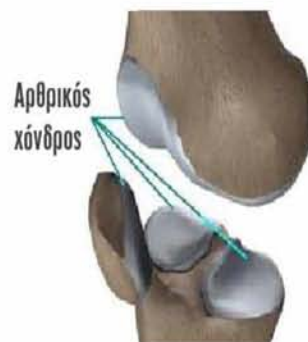
The mRNA levels of the inflammatory factors, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  were found to be down-regulated in OA chondrocytes and synovial cells after treatment with miR-146a mimic. Co-treatment with miR-140 and miR-146a mimic caused an additional reduction at the transcriptional levels of IL-6 in OA chondrocytes and synovial cells, while the mRNA levels of IL-1 $\beta$  were reduced only in OA synovial cells.



## **A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

### A.1. Δομή και λειτουργία αρθρικού χόνδρου

Ο φυσιολογικός αρθρικός χόνδρος, είναι ο ιστός ο οποίος καλύπτει και προστατεύει τα άκρα των οστών στις διαρθρώσεις, διευκολύνοντας την κίνηση(Oliviero, Ramonda, and Punzi 2010). Ο σχηματισμός του ξεκινάει κατά την εμβρυογένεση μέσω μίας διαδικασίας που ονομάζεται χονδρογένεση(Wieland et al. 2005)(Lawrence et al. 2008). Νωρίς κατά την εμβρυική ανάπτυξη το μεγαλύτερο μέρος του σκελετικού συστήματος είναι χόνδρος. Αυτός ο προσωρινός χόνδρος προοδευτικά αντικαθίσταται από οστό μέσω της ενδοχόνδριας οστεοποίησης(Lawrence et al. 2008), διαδικασία που ολοκληρώνεται στην εφηβεία, οπότε και δημιουργείται ο ενήλικος ώριμος αρθρικός χόνδρος. Σε αντίθεση με τον προσωρινό χόνδρο, ο ενήλικος αρθρικός χόνδρος δεν οστεοποιείται καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής αποτελώντας μία μόνιμη δομή(Εικόνα 1) (Wieland et al. 2005).



**Εικόνα 1:**ο αρθρικός χόνδρος(Wieland et al. 2005)

Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και τα χονδροκύτταρα αποτελούν τα κύρια συστατικά του ενήλικου αρθρικού χόνδρου. Τα χονδροκύτταρα είναι ο μοναδικός κυτταρικός πληθυσμός του χόνδρου και αποτελούν λιγότερο από το 5% του συνολικού όγκου του ιστού (η μικρότερη περιεκτικότητα σε κύτταρα σε σχέση με οποιονδήποτε άλλο ιστό του ανθρώπινου οργανισμού). Είναι επίσης τα κύτταρα που συνθέτουν τα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας του χόνδρου στην οποία είναι εμβαπτισμένα (Andrianakos et al. 2006a)(Felson and Zhang 1998). Η θεμέλια ουσία περιέχει ένα δίκτυο μακρομορίων, κυρίως κολλαγόνου (60% τύπου II, VI, IX και XI), πρωτεογλυκανών (25%-35%) και μη κολλαγονικών πρωτεϊνών με κυριότερες τις γλυκοπρωτεΐνες, ενώ είναι πλούσια σε νερό(Felson and Zhang 1998). Συγκεκριμένα περίπου το 75% του υγρού βάρους του αρθρικού χόνδρου είναι νερό και περίπου το 70% του ξηρού βάρους είναι κολλαγόνο(Baker, Walsh, and Mulhall 2011).

Ο αρθρικός χόνδρος αποτελεί έναν βασικό ιστό υψηλής οργάνωσης και μοναδικής υφής με κύριο ρόλο την προστασία του υποχόνδριου οστού από τις εμβιομηχανικές βλάβες κατά τη διάρκεια φόρτισης (κίνηση, έντονη φυσική δραστηριότητα) των αρθρώσεων και χρησιμεύει ως φορτιζόμενο ελαστικό υλικό, το οποίο είναι υπεύθυνο για την κατανομή των μηχανικών φορτίων που ασκούνται στις αρθρώσεις καθώς και για την χωρίς τριβή κίνηση των αρθρικών επιφανειών (συμβάλλει και το αρθρικό υγρό)(Goldring and Goldring 2007). Αυτά τα μηχανικά φορτία απορροφούνται

αρχικά από την εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του χόνδρου και στη συνέχεια διαχέονται και μεταβιβάζονται στα χονδροκύτταρα. Παρόλο που η ποιοτική του σύσταση είναι η ίδια σε όλες τις αρθρώσεις τα δομικά στοιχεία του εκτελούν τις ίδιες λειτουργίες, ο αρθρικός χόνδρος μπορεί να διαφέρει σε πάχος, κυτταρική περιεκτικότητα και σύσταση θεμέλιας ουσίας σε διάφορες περιοχές της ίδιας άρθρωσης, σε διαφορετικές αρθρώσεις και σε διαφορετικά είδη οργανισμών (Felson 2006).

Ο αρθρικός χόνδρος δεν διαθέτει αιμοφόρα αγγεία και λεμφαγγεία. Το οξυγόνο και τα απαραίτητα θρεπτικά συστατικά προωθούνται στα χονδροκύτταρα κυρίως μέσω διάχυσης από το αρθρικό υγρό και από τα αγγεία του υποχόνδριου οστού μέσω της ζώνης ασβεστοποίησης του χόνδρου (Lawrence et al. 1989a).

Επίσης, ο χόνδρος στερείται νεύρων και νευρικών απολήξεων, με αποτέλεσμα η βλάβη που εντοπίζεται αρχικά στο χόνδρο να μην γίνεται αντιληπτή. Θα πρέπει να επεκταθεί στον αρθρικό υμένα ή το υποχόνδριο οστό προκειμένου να εκδηλωθούν συμπτώματα (άλγος). Για το λόγο αυτό οι βλάβες κατά την έναρξη της οστεοαρθρίτιδας, που πιθανόν να είναι αντιμετωπίσιμες, δεν γίνονται έγκαιρα αντιληπτές.

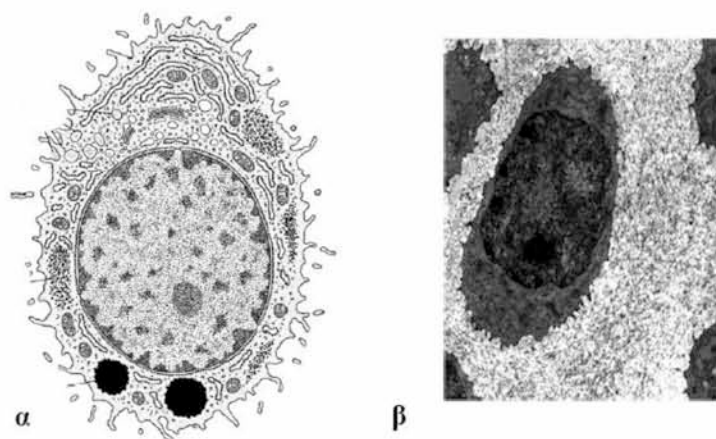
Η πορώδης και ελαστική δομή του αρθρικού χόνδρου (Lawrence et al. 1989a), η του φύση, η δομική και λειτουργική σχέση ανάμεσα στο δίκτυο ινών κολλαγόνου, στις πρωτεογλυκάνες, στα άλλα μόρια της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Lawrence et al. 1989a) (Sowers and Karvonen-Gutierrez 2010) και της υγρής φάσης, υπαγορεύουν τη μηχανική του συμπεριφορά. Το πιο σημαντικό ωστόσο είναι ότι ο φυσιολογικός αρθρικός χόνδρος στα πλαίσια μίας εξίσου φυσιολογικής μηχανικής φόρτισης, εξασφαλίζει το περιβάλλον για τη βέλτιστη ισορροπία ανάμεσα στις αναβολικές και καταβολικές δραστηριότητες των χονδροκυττάρων.

Τα χονδροκύτταρα είναι τελικά διαφοροποιημένα κύτταρα μεσεγχυματικής προέλευσης, τα οποία δεν διαιρούνται περαιτέρω σε φυσιολογικές συνθήκες (Anon n.d.), αποτελώντας τα μόνιμα κύτταρα του χόνδρου (Felson 2006). Ευθύνονται τόσο για τη διατήρηση της φυσιολογικής δομής και λειτουργίας του, όσο και για την αναδιαμόρφωση του σε καταστάσεις βλάβης.

Παρά το γεγονός, ότι χονδροκύτταρα από διαφορετικές στοιβάδες του αρθρικού χόνδρου διαφέρουν σε σχήμα, μέγεθος και πιθανόν στη μεταβολική δραστηριότητα (Martel-Pelletier et al. 2008), εμφανίζουν τα παρακάτω γενικά χαρακτηριστικά: είναι μεγάλα κύτταρα με στρογγυλό ή ωοειδή πυρήνα, που περικλείεται από πυρηνικό περίβλημα. Περιέχουν όλα τα κοινά κυτταρικά συστατικά

κυρίως αυτά που είναι απαραίτητα για τη σύνθεση ή την αποικοδόμηση της θεμέλιας ουσίας, όπως λείο και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, σύστημα Golgi και λυσοσωμάτια. Επίσης περιέχουν μιτοχόνδρια, γλυκογόνο, εκκριτικά κυστίδια (**Εικόνα 2**). Τα χονδροκύτταρα βρίσκονται σε συνεχή επικοινωνία με τη θεμέλια ουσία και τα συστατικά της αλλά και με το ευρύτερο περιβάλλον τους μέσω υποδοχέων που διαθέτουν στην κυτταρική επιφάνειά τους. Μεταξύ των υποδοχέων συγκαταλέγονται ιντεγκρίνες, υποδοχείς για κυτοκίνες και αυξητικούς παράγοντες, για τα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας (Anon n.d.), ιστικές ορμόνες αλλά και υποδοχείς διαμεσολαβητές φλεγμονής και ανοσοσφαιρινών και με τον τρόπο αυτό αντιλαμβάνονται και αντιδρούν σε αλλαγές του περιβάλλοντος τους (Bian et al. 2016). Τα ίδια τα χονδροκύτταρα επίσης έχουν την ικανότητα να παράγουν αρκετούς από αυτούς τους παράγοντες ως απάντηση σε εξωκυττάρια ερεθίσματα.

Τα χονδροκύτταρα διαβιούν σε ένα περιβάλλον εξαιρετικά χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και εξαρτώνται από αναερόβιο μεταβολισμό (κυρίως τα χονδροκύτταρα των βαθύτερων στιβάδων). Σε περιπτώσεις παθολογικών καταστάσεων, η ισορροπία αερόβιας και αναερόβιας μεταβολικής οδού διαταράσσεται με αποτέλεσμα τα κύτταρα, ακόμα και της επιφανειακής ζώνης που εμφανίζουν χαμηλό αερόβιο μεταβολισμό, να εξαρτώνται αποκλειστικά από αναερόβια αναπνοή και μεταβολισμό και να είναι πιθανή η επικείμενη καταστροφή τους.

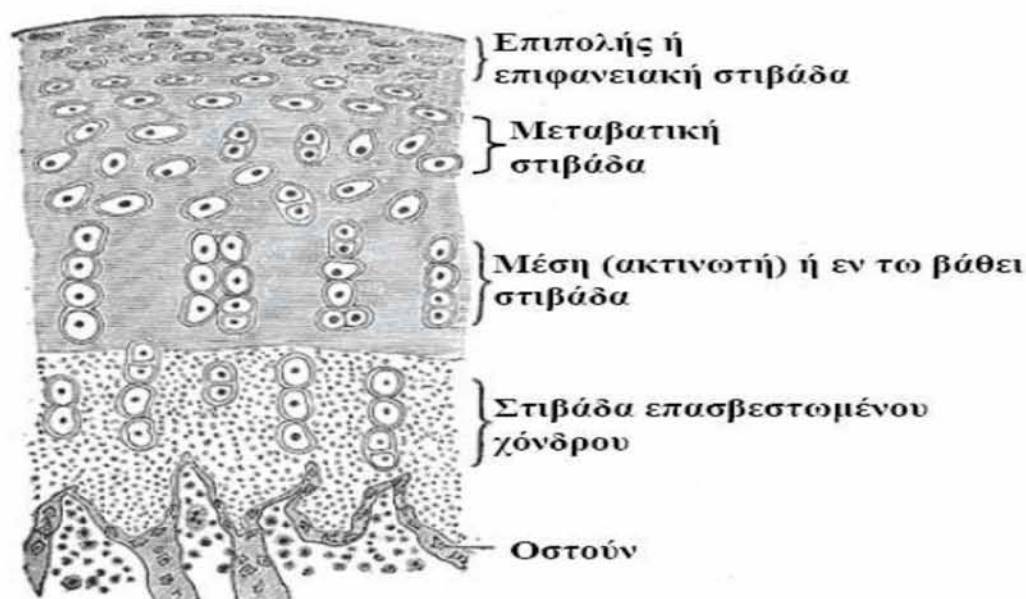


**Εικόνα 2:** Χονδροκύτταρο (α), στρογγυλός ή ωοειδής πυρήνας με πυρηνικό περίβλημα, λείο και αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, συσκευή Golgi, λυσοσωμάτια, μιτοχόνδρια, ενδοκυτοπλασματικά ινίδια, λιπίδια, γλυκογόνο και εκκριτικά κυστίδια (Anon n.d.).



## Α.2.Στιβάδες αρθρικού χόνδρου

Διακρίνονται λειτουργικά, τέσσερις ανατομικές στιβάδες κατά μήκους του αρθρικού χόνδρου μέχρι το υποχόνδριο οστό. Εξαιτίας των μορφολογικών διαφορών των χονδροκυττάρων και της θεμέλιας ουσίας οι τέσσερις αυτές στιβάδες ή ζώνες είναι οι εξής: η επιπολής ή επιφανειακή στιβάδα (superficial tangential zone), η μεταβατική στιβάδα (middle or transitional zone), η μέση (ακτινωτή) ή εν τω βάθει στιβάδα (deep or radial zone) και η ζώνη ασβεστοποίησης ή στιβάδα επασβεστωμένου χόνδρου (calcified cartilage zone)(Εικόνα 3).



**Εικόνα 3:** Απεικόνιση των στιβάδων του αρθρικού χόνδρου(Lawrence et al. 1989a)

Η επιπολής ή επιφανειακή στιβάδα, το πάνω μέρος της οποίας αποτελεί την αρθρική επιφάνεια, είναι λεία και συνεχής. Τα χονδροκύτταρα είναι πεπλατυσμένα και οργανώνονται μέσα στη θεμέλια ουσία χωρίς σημάδια πολλαπλασιασμού και αποτελούν τα χονδροκύτταρα που συνθέτουν τον μόνιμο χόνδρο. Οι ίνες κολλαγόνου είναι λεπτότερες και λιγότερες απ' ότι στις βαθύτερες ζώνες και έχουν προσανατολισμό παράλληλο με την αρθρική επιφάνεια. Το πάχος αυτής της ζώνης είναι ίσου με 10%-20% του συνολικού πάχους του αρθρικού χόνδρου.

Η μεταβατική στιβάδα, περιλαμβάνει πιο σφαιρικά χονδροκύτταρα και ακτινωτές δέσμες παχύτερων ινιδίων κολλαγόνου με τυχαίο προσανατολισμό. Το πάχος αυτής της ζώνης είναι ίσο με 40%-60% του συνολικού(Lawrence et al. 1989a).

Στη μέση ακτινωτή ή εν τω βάθει στιβάδα, τα χονδροκύτταρα είναι ελλειψοειδή με τον μεγάλο άξονά τους κάθετο στην αρθρική επιφάνεια. Οι δέσμες των ινιδίων κολλαγόνου είναι ακόμα παχύτερες και ακτινικά προσανατολισμένες και κάθετες προς το οστό. Το πάχος αυτής της ζώνης είναι ίσο με το 30% του συνολικού(Lawrence et al. 1989a).

Τέλος, η ζώνη ασβεστοποίησης βρίσκεται πριν το υποχόνδριο οστό και αποτελεί το σύνορο μεταξύ χόνδρου και υποχόνδριου οστού. Περιέχει υπερτροφικά χονδροκύτταρα που εκφράζουν κυρίως κολλαγόνο X, οι ίνες του οποίου είναι προσανατολισμένες ακτινικά και στηρίζονται μέσα στο υποχόνδριο οστό.

Συνεπάγεται από τη μορφολογία των τεσσάρων στιβάδων, ότι τα χονδροκύτταρα σε κάθε στιβάδα ή ζώνη διαφέρουν όχι μόνο στο σχήμα, το μέγεθος και τον προσανατολισμό σε σχέση με την αρθρική επιφάνεια αλλά και ως προς τις μεταβολικές τους δραστηριότητες καθώς υπάρχουν διαφορές στη δομή της θεμέλιας ουσίας και στα ινίδια του κολλαγόνου(Martel-Pelletier et al. 2008). Συμπεραίνεται, ότι η διατήρηση της δομής και της λειτουργίας του φυσιολογικού αρθρικού χόνδρου εξαρτάται εν μέρει και από τη διαφοροποίηση των διαφορετικών φαινοτυπικά χονδροκυττάρων.

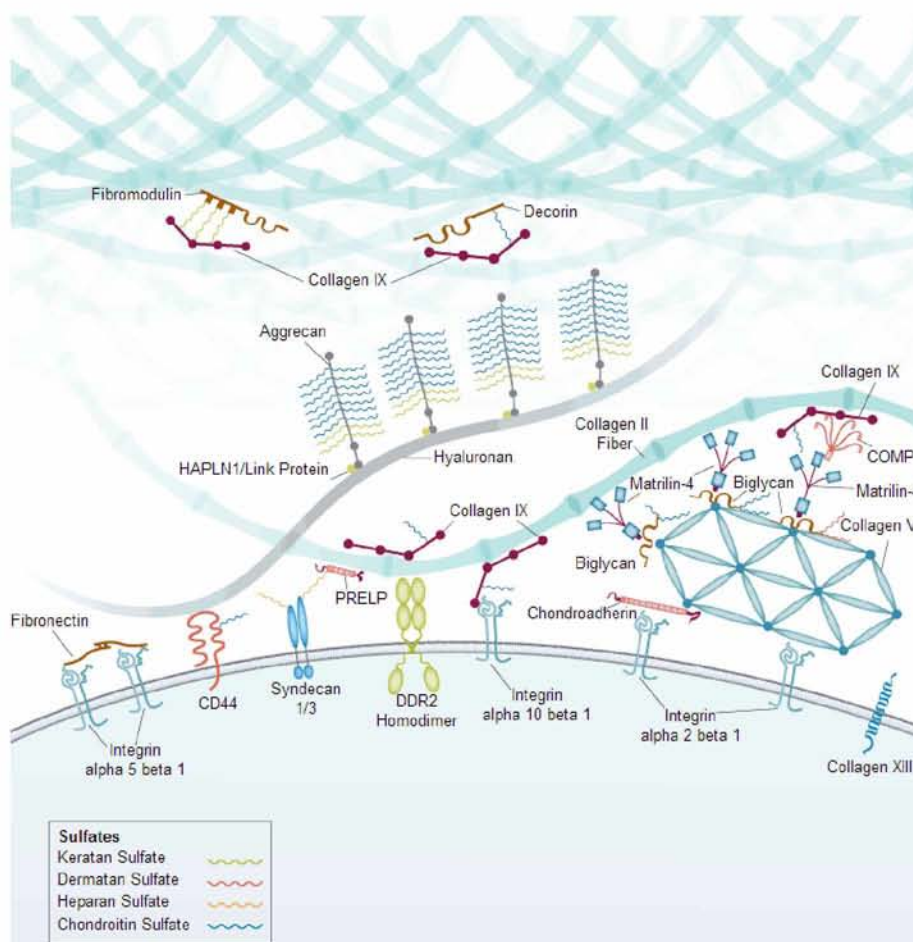
### **A.3 Εξωκυττάρια θεμέλια ουσία και κυτταρικές αλληλεπιδράσεις.**

Η εξωκυττάρια θεμέλια ουσία του αρθρικού χόνδρου έχει μηχανική και βιολογική δράση. Εξασφαλίζει ομοιομερή κατανομή των φορτίων της άρθρωσης σε όλη την έκταση του αρθρικού χόνδρου, προσδίδει στον αρθρικό χόνδρο σταθερότητα, ευκαμψία, ελαστικότητα και επιτρέπει την ομαλή κίνηση των αρθρικών επιφανειών με πολύ χαμηλό συντελεστή τριβής (30% μικρότερο από την πιο τέλεια τεχνητή άρθρωση) (Felson 2006).

Όπως προαναφέρθηκε, ο αρθρικός χόνδρος είναι ένας ιστός που στερείται αγγείων και νεύρων με αποτέλεσμα να εμφανίζει μικρή τάση αυτό-επισκευής μετά από κάποιο τραυματισμό. Οι τραυματισμοί αυτοί που παραμένουν για χρόνια μπορεί τελικά να οδηγήσουν σε περαιτέρω εκφυλισμό του. Αντίθετα, η ECM ανανεώνεται συνεχώς μέσω της παραγωγής ενζύμων καταβολισμού (MMPS) και παραγόντων αναβολισμού(Gao et al. 2014)(Guilak et al. 2018).

Οι πρωτεογλυκάνες της ECM περιλαμβάνουν τις γλυκοζαμινογλυκάνες, το υαλουρονικό οξύ, ίνες κολλαγόνου και άλλα μοριακά συστατικά (Εικόνα 4) . Οι ίνες αποτελούνται από ελαστίνη και κολλαγόνο διαφόρων τύπων (I,II,III,IV,V,VIII,IX,X).

Τα διάφορα συστατικά της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας αλληλεπιδρούν με το γειτονικό περιβάλλον μέσω της δράσης των ιντεργκρινών. Οι ιντεργκρίνες είναι διαμεμβρανικοί υποδοχείς οι οποίοι διαμεσολαβούν στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρων και του περιβάλλοντος χώρου. Συμμετέχουν επίσης στην ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, στη διαμόρφωση του σχήματος των κυττάρων, στην κυτταρική προσκόλληση, στην οργάνωση του κυτταροσκελετού κ.λπ.(Gao et al. 2014).



**Εικόνα 4:** Δομή και αλληλεπιδράσεις της εξωκυττάριας ουσίας του αρθρικού χόνδρου

Νωρίς κατά την εμβρυογένεση, σχηματίζεται το σκελετικό σύστημα το οποίο προέρχεται από το βλαστικό στρώμα του μεσοδέρματος. Η χονδρογένεση είναι η κύρια διαδικασία μέσω της οποίας δημιουργείται ο χόνδρος, από μεσεγχευματικό ιστό, διαφοροποιείται σε χονδροκύτταρα και αρχίζει να εκκρίνει μόρια της ECM. Η διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που χαρακτηρίζεται από διαδοχικές αλλαγές στην κυτταρική μορφολογία και στην γονιδιακή έκφραση. Κατά την πρώιμη εμβρυική ανάπτυξη το μεγαλύτερο μέρος του σκελετικού συστήματος αποτελείται από χόνδρο. Αυτός ο χόνδρος είναι προσωρινός

και σταδιακά αντικαθίσταται από το οστό μέσω της ενδοχόνδριας οστεοποίησης, μιας διαδικασίας που ολοκληρώνεται κατά την εφηβεία. Αντίθετα ο χόνδρος που καλύπτει τις αρθρώσεις δεν οστεοποιείται και ονομάζεται μόνιμος χόνδρος(Gao et al. 2014)(Ripmeester et al. 2018a) .

Η ανάπτυξη, η συντήρηση και η επιδιόρθωση του αρθρικού χόνδρου ελέγχεται από αυστηρές σηματοδοτικές οδούς στις οποίες συμμετέχουν σημαντικοί παράγοντες, μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται ο TGF-b, MMP-9, MMP-13, VEGF-a, IGF-a οι οποίοι δρουν σε πολλές περιπτώσεις συνεργιστικά και ενισχύουν την δυναμική της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας(Guilak et al. 2018)(Ripmeester et al. 2018a).

Η υπερικογένεια του TGF-b αποτελείται από περισσότερα από σαράντα μέλη συμπεριλαμβανομένων και των BMPs(Ripmeester et al. 2018a). Μαζί με τον αυξητικό παράγοντα ινσουλίνης (IGF-I)(Hellewell and Adams 2016) και τον αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών (FGF) θεωρούνται αναβολικά στοιχεία του χόνδρου(Gao et al. 2014). Ο TGF-b αλληλεπιδρά και ενεργοποιεί τις smad1/5/8 και επάγει την φωσφορυλίωση της smad2/3 μέσω της κινάσης ALK. Αυτές οι οδοί σηματοδότησης εμπλέκονται στην διαμόρφωση του φαινοτύπου και στην διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων(Gao et al. 2014)(Ripmeester et al. 2018a).

Οι BMPs συμμετέχουν σε όλες τις φάσεις της χονδρογένεσης και της ενδοχόνδριας οστεοποίησης. Η δράση τους ασκείται μέσω των smad1/5/8 και smad4 που λειτουργούν ως κρίσιμοι μεταγραφικοί παράγοντες. Αν και οι BMPs φαίνεται ότι δρουν προστατευτικά για τον χόνδρο, ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν στην αποικοδόμηση της ECM και στην υπερτροφία των χονδροκυττάρων. Η BMP-2 για παράδειγμα μπορεί να επάγει την υπερτροφία των χονδροκυττάρων και την αποικοδόμηση του χόνδρου αυξάνοντας την έκφραση της μεταλλοπρωτεϊνάσης MMP-13(Gao et al. 2014)(Guilak et al. 2018)(Muttigi et al. 2016).

Ο ρόλος του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης (IGF-I) στο μεταβολισμό του αρθρικού χόνδρου έχει διερευνηθεί εκτενώς τόσο σε φυσιολογικές όσο και σε παθολογικές καταστάσεις. Ο IGF-I προκαλεί μια πληθώρα αναβολικών αποκρίσεων ενώ ελαττώνει τις καταβολικές διεργασίες και συγκεκριμένα διεγείρει την σύνθεση της εξωκυττάριας θεμέλιας ουσίας και επιταχύνει τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των προγονικών κυττάρων του χόνδρου. Οι IGFBPs, είναι πρωτεΐνες που εμφανίζουν υψηλή συγγένεια για τον IGF-I και διαμορφώνουν την δράση του(Gao et al. 2014)(Tardif et al. 2009a).



Ένα άλλο κύριο συστατικό της ECM είναι η αγκρεκάνη, η οποία είναι πρωτεογλυκάνη που προσδίδει αντοχή στην άρθρωση. Η αγκρεκάνη αποικοδομείται από τις πρωτεΐνες ADAMTS-4 και ADAMTS-5, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των αγκρεκανασών, καταστέλλονται από τον παράγοντα TIMP, και σε φυσιολογικές καταστάσεις υπόκεινται σε αυστηρή ρύθμιση της έκφρασης τους για την διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ αναβολισμού και καταβολισμού της αγκρεκάνης (Gao et al. 2014) (Verma and Dalal 2011).

Η οικογένεια των MMPs αποτελείται από τις κολλαγενάσες, οι οποίες είναι πρωτεΐνες των θηλαστικών. Οι κολλαγενάσες είναι ένζυμα που στοχεύουν και αποικοδομούν ειδικά ορισμένους τύπους κολλαγόνου. Η MMP-13 παραδέγματος χάριν αποικοδομεί το κολλαγόνο τύπου II, το οποίο αποτελεί κύριο συστατικό της ECM του χόνδρου με αποτέλεσμα να επιφέρει αλλαγές στην δομή και την λειτουργία της. Οι ενεργοποιημένες MMPs καταστέλλονται από τους αναστολείς των μεταλλοπρωτεασών (TIMPs) όπως ακριβώς και οι αγκρεκανάσες (Lu et al. 2011) (Li et al. 2017).

Η διατήρηση της ομοιόστασης του αρθρικού χόνδρου απαιτεί αυστηρή ρύθμιση μιας ποικιλίας σηματοδοτικών οδών και η εμφάνιση και η εξέλιξη των αρθρικών παθήσεων προκαλούνται συχνά από ανωμαλίες στην σηματοδότηση. Σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η οστεοαρθρίτιδα, διαταράσσεται η ομοιοστασία του χόνδρου με αποτέλεσμα μεταξύ σύνθεσης και καταβολισμού των συστατικών της ECM να μετατοπίζεται προς την πλευρά των καταβολικών γεγονότων προωθώντας τον σταδιακό εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου.

#### **A.4. Οστεοαρθρίτιδα**

Η εκφυλιστική αρθρίτιδα ή οστεοαρθρίτιδα (OA) είναι η πιο συχνή πάθηση των αρθρώσεων, αποτελώντας τη συχνότερη μορφή αρθρίτιδας (50% όλων των μορφών αρθρίτιδας), με κύριο χαρακτηριστικό τον προοδευτικό εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου, ο οποίος σταδιακά καθίσταται μαλακός και διαβρώνεται κατά τόπους (Εικόνα 5). Συνοδεύεται επίσης από αντιδραστική παραγωγή νέου οστού στην περιφέρεια της άρθρωσης (οστεόφυτα) και πάχυνση και σκλήρυνση του αρθρικού υμένα (Peach, Carr, and Loughlin 2005) (Goldring and Goldring n.d.). Σύμφωνα με τον Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (Π.Ο.Υ.), περίπου 40 εκατομμύρια άνθρωποι πάσχουν από οστεοαρθρίτιδα και υπολογίζεται ότι ο αριθμός αυτός θα αυξηθεί στα 60 εκατομμύρια το 2020 (Martel-Pelletier 2004).

Παρόλο που περιγράφεται ως μη φλεγμονώδης ασθένεια, προκειμένου να διακρίνεται από τη φλεγμονώδη αρθρίτιδα, όπως η ρευματοειδής αρθρίτιδα (ΡΑ), είναι γνωστό ότι η φλεγμονή των αρθρώσεων συμβάλλει σημαντικά στην πρόοδο της ασθένειας (Pitsillides and Beier 2011).



**Εικόνα 5:** Φυσιολογική και ΟΑ άρθρωση όπου απεικονίζεται η φθορά του αρθρικού χόνδρου

Η ΟΑ διακρίνεται σε πρωτοπαθή ή ιδιοπαθή όταν η αιτία ανάπτυξής της δεν είναι εμφανής και ως εκ τούτου συνεπάγεται την πολυπαραγοντικότητα της νόσου και σε δευτεροπαθή όταν εμφανίζεται ως αποτέλεσμα κάκωσης ή μίας ποικιλίας συγγενών, αναπτυξιακών, φλεγμονωδών και νευρολογικών διαταραχών (π.χ. νόσος Paget, σύνδρομο Ehlers- Danlos, αιμοχρωμάτωση, χονδροασβέστωση νευροπαθητική αρθροπάθεια, κ.α.). Η ιδιοπαθής ΟΑ σπάνια εμφανίζεται σε άτομα νεαρότερα των 40 ετών, σε αντίθεση με τη δευτεροπαθή η οποία μπορεί να εμφανιστεί και σε νεαρότερες ηλικίες (Tchetina 2011). Ωστόσο, στις περισσότερες περιπτώσεις συνυπάρχουν πρωτοπαθείς και δευτεροπαθείς παράγοντες (Goldring and Goldring n.d.).

Οποιαδήποτε άρθρωση του σώματος μπορεί να προσβληθεί από ΟΑ αν και αρχικά προσβάλλεται μόνο μία άρθρωση. Ωστόσο, κάποιες αρθρώσεις (γόνατο, ισχίο, σπονδυλική στήλη) προσβάλλονται συχνότερα εν συγκρίσει με άλλες (αγκώνας, ποδοκνημική) (Goldring and Goldring n.d.). Επίσης, εκτός από τον αρθρικό χόνδρο

προσβάλλονται όλα τα στοιχεία μίας άρθρωσης (μηνίσκος, τένοντες, υμένας, υποχόνδριο οστό) (Heinegård and Saxne 2011).

Τα κύρια συμπτώματα της οστεοαρθρίτιδας είναι ο πόνος των προσβεβλημένων αρθρώσεων και μάλιστα όσο πιο εκτεταμένη είναι η φθορά του αρθρικού χόνδρου τόσο ισχυρότερος είναι. Παρόλα αυτά η συσχέτιση του πόνου με το βαθμό φθοράς ποικίλλει μεταξύ των αρθρώσεων αλλά και μεταξύ των διαφόρων ασθενών (Goldring and Goldring n.d.).

Προς τα παρόν δεν υπάρχουν διαθέσιμοι δείκτες για την έγκαιρη διάγνωση της ΟΑ σε πρώιμα στάδια ούτε αποτελεσματική θεραπεία παρά μόνο συμπτωματική αντιμετώπιση της νόσου. Οι σύγχρονες θεραπευτικές μέθοδοι περιορίζονται στη χρήση μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών (NSAIDS) και σε χειρουργικές επεμβάσεις (Yamazaki et al. 2003). Τα μοριακά γεγονότα και η παθοφυσιολογία των εκφυλιστικών αλλοιώσεων της άρθρωσης που οδηγούν στο κλινικό σύνδρομο της ΟΑ έχουν διευκρινιστεί σε πολύ μικρό βαθμό αν και έχει σημειωθεί σημαντική πρόοδος στον καθορισμό των πιθανών μηχανισμών που ευθύνονται για τον προοδευτικό εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου.

#### **A.5 Επιδημιολογία της ΟΑ**

Η σύγχρονες μελέτες επιδημιολογίας δείχνουν ότι η ΟΑ είναι μια νόσος μείζονος ενδιαφέροντος που συνοδεύεται από τεράστιες οικονομικές και κοινωνικές επιπτώσεις (Pelletier, Martel-Pelletier, and Abramson 2001). Αποδεδειγμένα η ΟΑ αναφέρεται ως η κύρια αιτία νοσηρότητας στις ανεπτυγμένες χώρες ενώ κατέχει τη δεύτερη θέση των χρόνιων νοσημάτων. Η ΟΑ αποτελεί χρόνια κατάσταση και επηρεάζει κυρίως άτομα μέσης και τρίτης ηλικίας (>65 ετών), ευθύνεται δε για το μεγαλύτερο ποσοστό αναπηρίας και χαμηλού βιοτικού επιπέδου σε όλες τις χώρες του δυτικού κόσμου (Ευρώπη, Ηνωμένες πολιτείες, Καναδάς, Αυστραλία) κατάσταση που αναμένεται να επιβαρυνθεί με την αυξανόμενη γήρανση του πληθυσμού (Ishiguro, Kojima, and Poole 2002). Η Π.Ο.Υ. επίσης υπολογίζει ότι το 10% του πληθυσμού της γης άνω των 60 πάσχει από οστεοαρθρίτιδα και ότι το 80% των ατόμων αυτών έχει κάποιου βαθμού περιορισμένη δραστηριότητα ενώ το 20% δεν μπορεί να εκτελέσει τις βασικές λειτουργίες της καθημερινής ζωής. Όσον αφορά τη χώρα μας σύμφωνα με την Πανελλήνια Επιδημιολογική Έρευνα για τις ρευματικές παθήσεις στο γενικό πληθυσμό που οργανώθηκε και πραγματοποιήθηκε από το Ελληνικό Ίδρυμα Ρευματολογικών Ερευνών (2006) βρέθηκε ότι ο συνολικός

επιπολασμός της συμπτωματικής ΟΑ, που αφορά στις αρθρώσεις τόσο των άνω και κάτω άκρων όσο και της σπονδυλικής στήλης ανέρχεται στο 13,1% των ενηλίκων (Umlauf et al. 2010). Αυτό συνεπάγεται μια τεράστια επιβάρυνση του κρατικού προϋπολογισμού τόσο λόγω της παράτασης του μέσου όρου ζωής όσο και της αποχής των πασχόντων από τις επαγγελματικές τους υποχρεώσεις, διότι η οστεοαρθρίτιδα αποτελεί μια μορφή αναπηρίας (Zhang and Jordan 2010). Μια άλλη παράμετρος που διαφοροποιεί τον επιπολασμό της νόσου σε διάφορες επιδημιολογικές μελέτες είναι το φύλο. Σύμφωνα με τις μελέτες αυτές μετά την ηλικία των 55 ετών οι γυναίκες προσβάλλονται με μεγαλύτερη συχνότητα από ότι οι άνδρες από την νόσο, εκδηλώνοντας μάλιστα βαρύτερα συμπτώματα. Επιπλέον μεταξύ ανδρών και γυναικών διαφοροποιείται και η περιοχή εντόπισης των συμπτωμάτων της πάθησης καθώς στις γυναίκες προσβάλλονται με μεγαλύτερη συχνότητα οι αρθρώσεις των άκρων των χεριών , ενώ στους άνδρες προσβάλλεται κυρίως το ισχίο (Pelletier et al. 2001)(Zhang and Jordan 2010)(Sowers 2001).

#### **A.6 Πολλαπλοί φαινότυποι στην ΟΑ. Σύστημα ταξινόμησης KELLGRN-LAWRENCE.**

Επιπρόσθετα, η μελέτη της επιδημιολογίας της ΟΑ εμφανίζει αρκετές δυσκολίες λόγω της ετερογένειας που παρουσιάζει η νόσος. Συγκεκριμένα, ένα μεγάλο ποσοστό ατόμων που έχει διαγνωσθεί με ΟΑ εμφανίζει αρκετές διαφορές που αφορούν κυρίως διαφορετικά παθολογικά πρότυπα στις περιοχές που προσβάλλονται κατά κύριο λόγο από την ΟΑ , δυσκολία στην έγκυρη και σωστή διάγνωση , ασάφεια στην διάγνωση, απεικονιστικές ενδείξεις της ΟΑ σε ασθενείς χωρίς συμπτώματα κ.λπ(Andrianakos et al. 2006b)(Lawrence et al. 1989b)(Pereira et al. 2011).Όλες αυτές οι δυσκολίες έχουν οδηγήσει στην ύπαρξη πολλών φαινοτύπων που μπορούν να εξηγήσουν ένα μέρος της ετερογένειας που εμφανίζει η νόσος. Οι φαινότυποι αυτοί περιλαμβάνουν τον χρόνια πόνο, την φλεγμονώδη οστεοαρθρίτιδα που σχετίζεται κυρίως με μετα-τραυματική εκδήλωση της νόσου, το μεταβολικό σύνδρομο, τον φαινότυπο που έχει προκληθεί λόγω μηχανικής πίεσης και κυρίως λόγω υψηλού ΒΜΙ και την ιδιοπαθή οστεοαρθρίτιδα(Pereira et al. 2011).

Ωστόσο, όλοι αυτοί οι φαινότυποι εμφανίζουν αρκετά κοινά παθοφυσιολογικά σημεία στις απεικονιστικές μελέτες, με αποτέλεσμα ο διαχωρισμός τους να καθίσταται εξαιρετικά δύσκολος. Για την ταξινόμηση του σταδίου στο οποίο

βρίσκονται οι ασθενείς με OA έχει επικρατήσει και χρησιμοποιείται η κλίμακα βαθμολόγησης Kellgren-Lawrence (K/Lscore). Η κλίμακα αυτή στηρίζεται στα απεικονιστικά-ακτινογραφικά ευρήματα, παίρνει τιμές από 0-4 και η τιμή 2 αποτελεί το κατώφλι για να μπορέσει να τεθεί η διάγνωση(Pereira et al. 2011).

#### **A.7 Παράγοντες κινδύνου**

Ως παράγοντες κινδύνου αναφέρονται η ηλικία (Garvican et al. 2010), το φύλο (Garvican et al. 2010), γενετικές ανωμαλίες(Garvican et al. 2010)(Buckwalter, Mankin, and Grodzinsky 2005), εμβιομηχανικοί παράγοντες (συγγενείς δυσπλασίες (Buckwalter et al. 2005), μειωμένη μυϊκή δύναμη (Buckwalter et al. 2005), εκτεταμένη επιβάρυνση της άρθρωσης, επάγγελμα(Buckwalter et al. 2005), ύπαρξη προϋπάρχουσας πάθησης ή τραύματος (Buckwalter et al. 2005), ο δείκτης μάζας σώματος (BMI- BoneMassIndex)(Poole et al. 2003),περιβαλλοντικοί παράγοντες (Smith 2006), η φυλή (Goldring and Goldring n.d.) καθώς και μεταβολικές διαταραχές (Myllyharju and Kivirikko 2001)(Felson 2009)(Rizkalla et al. 1992).Η συχνότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνει με την ηλικία χωρίς αυτό να σημαίνει ότι εμφανίζεται αναπόφευκτα με τη γήρανση, αλλά επισημαίνεται ότι απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα για εκδήλωση κλινικής συμπτωματολογίας (Εικόνα 6)(Goldring and Goldring n.d.). Επίσης, η ασθένεια είναι σημαντικά συχνότερη στις γυναίκες (50% μεγαλύτερος κίνδυνος) συγκριτικά με τους άντρες (Garvican et al. 2010).

**Ηλικία:** Δεδομένου ότι ο αρθρικός χόνδρος υφίσταται σημαντικές αλλοιώσεις με το πέρασμα του χρόνου , όπως άλλωστε συμβαίνει και με τους περισσότερους ιστούς, η συχνότητα εμφάνισης της νόσου αυξάνεται δραματικά στους ηλικιωμένους άνω των 65 ετών και πλησιάζει σε ποσοστό εμφάνισης της νόσου περίπου το 80%. Σε όλη αυτή την κατάσταση συνηγορεί και το γεγονός ότι η ελαστικότητα του αρθρικού χόνδρου μεγιστοποιείται μέχρι την ηλικία των 30 ετών περίπου και εν συνεχεία προοδευτικά μειώνεται(Poole et al. 2002).

**Κληρονομικότητα:** Αρκετές μελέτες αναφέρουν ότι γενετικοί παράγοντες ευθύνονται για την εμφάνιση της πάθησης. Ένα γονίδιο, μεταλλαγές του οποίου έχουν συσχετισθεί με την εμφάνιση της OA, είναι το COL2A, το οποίο εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 12. Οι μεταλλάξεις του γονιδίου αυτού προδιαθέτουν για την πρόωρη εμφάνιση της νόσου και με βαρύτερα συμπτώματα, γεγονός που εξηγείται κι από τον σημαντικό ρόλο που κατέχει το κολλαγόνο τύπου II στην άρθρωση(Poole et al. 2002)(Spector et al. 1996). Μέχρι σήμερα έχουν συσχετισθεί περίπου 21 γενετικοί

τόποι οι , οι οποίοι ευθύνονται για την εμφάνιση της ΟΑ(Sharma 2016)(Cucchiari et al. 2016).

**Παράγοντες διατροφής:** Μελέτες έχουν δείξει ότι η βιταμίνη C και το ασκορβικό οξύ λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους δρουν προστατευτικά στον αρθρικό χόνδρο, καθώς συνεισφέρουν στην αποφυγή της καταστροφής του από την οξειδωτική βλάβη. Επιπλέον, η βιταμίνη D έχει φανεί ότι συμμετέχει σε μονοπάτια του οστικού μεταβολισμού(CHANG et al. 2015)(McAlindon et al. 1996).

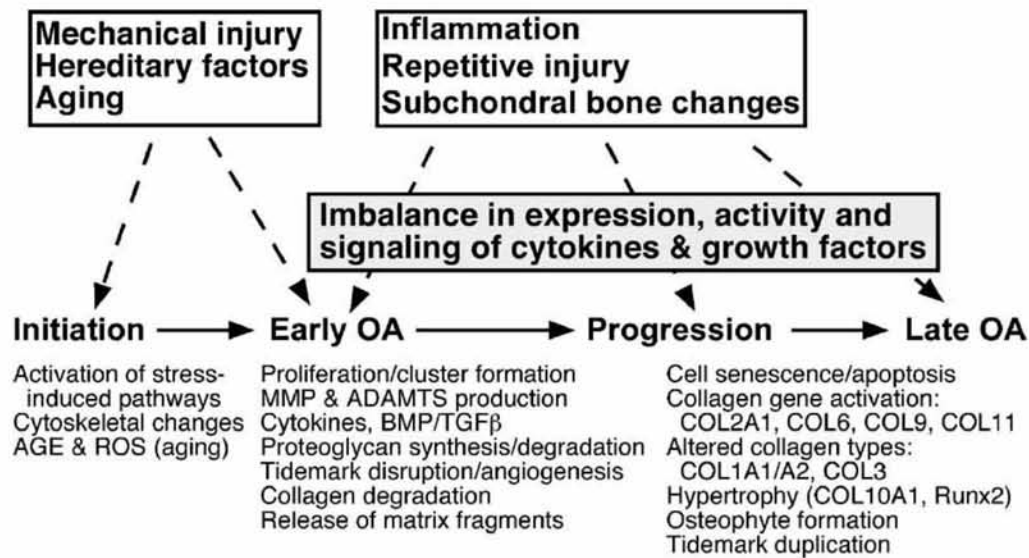
**Συγγενείς και γενετικές παθήσεις:** Πολλές συγγενείς και γενετικές ανωμαλίες οι οποίες προσβάλλουν τις αρθρώσεις, προκαλούν αστάθεια της άρθρωσης η οποία μπορεί έμμεσα να οδηγήσει στην εμφάνιση της οστεοαρθρίτιδας. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί η νόσος Legg Perthes η οποία προοδευτικά μπορεί να οδηγήσει σε εμφάνιση της ΟΑ(Felson et al. 2000)(Lane et al. 2000).

**Σοβαροί τραυματισμοί της άρθρωσης:** Οι σοβαροί τραυματισμοί, όπως ένα σοβαρό κάταγμα η ρήξη μηνίσκου έχουν συσχετισθεί σε μεγάλο βαθμό με την ανάπτυξη κυρίως φλεγμονώδους ΟΑ και μάλιστα σε νεαρότερη ηλικία(Lane et al. 2000).

**Παχυσαρκία:** Από μια σειρά εκτεταμένων ερευνών έχει φανεί ότι ένα παχύσαρκο άτομο έχει πολύ μεγαλύτερες πιθανότητες να αναπτύξει ΟΑ γόνατος σε σχέση με ένα λεπτόσωμο άτομο. Μια πιθανή εξήγηση για αυτό είναι ότι οι αρθρώσεις των παχύσαρκων ατόμων δέχονται μεγαλύτερη μηχανική φόρτιση. Βέβαια, η εξήγηση αυτή έρχεται σε αντίθεση με τα ευρήματα μιας άλλης έρευνας, σύμφωνα με την οποία υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ ΟΑ χεριών και παχυσαρκίας, πιθανολογώντας την ύπαρξη κι άλλων παραγόντων που συμμετέχουν στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου(Collins et al. 2018).

**Επαγγελματικές και σωματικές δραστηριότητες:** Μελέτες έχουν δείξει ότι όσο περισσότερο υπερφορτώνεται μια άρθρωση τόσο περισσότερες αλλοιώσεις υφίστανται. Πέραν του γεγονότος ότι η άθληση και η σωματική δραστηριότητα θα μπορούσε να συμβάλλει στην αντιμετώπιση της ΟΑ, ωστόσο μπορεί την ίδια στιγμή να οδηγήσει και στην εμφάνιση της νόσου. Συγκεκριμένα η εκδήλωση της ΟΑ έχει συσχετισθεί με κάποια αθλήματα (π.χ τρέξιμο, ποδόσφαιρο κ.λπ) και με «κάποια» βαριά επαγγέλματα που απαιτούν έντονη χειρονακτική δραστηριότητα και σωματική συμμετοχή (π.χ αγρότες). Ωστόσο οι απόψεις δίστανται γιατί τα στοιχεία αυτών των μελετών παραμένουν ανεπαρκή και αμφισβητήσιμα(Anderson and Felson 1988)(Wilder, Barrett, and Farina 2006)(Croft et al. 1992).

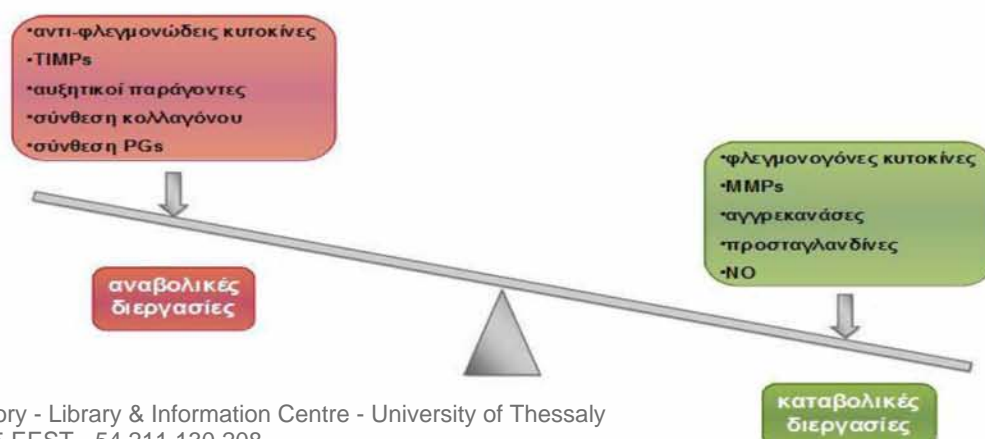




Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των παραγόντων αιτιοπαθογένειας της OA. (Nielsen et al. 2017)

## A.8 Ο αρθρικός χόνδρος στην OA

Η παθολογία της OA διέπεται από διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ των αναβολικών και των καταβολικών διεργασιών που λαμβάνουν χώρα σε όλη την άρθρωση. Κατά την εξέλιξη της νόσου, η φυσιολογική λειτουργία του αρθρικού χόνδρου διαταράσσεται, όπως προαναφέρθηκε και οι αλλαγές που συμβαίνουν είναι αποτέλεσμα της αλλαγής που υφίσταται η λειτουργικότητα των χονδροκυττάρων (Εικόνα 7). Στην OA, τα χονδροκύτταρα σε μια προσπάθεια επιδιόρθωσης του χόνδρου που έχει καταστραφεί, αυξάνουν την βιοσυνθετική τους δραστηριότητα και ενισχύουν την παραγωγή κολλαγόνου τύπου II, ενώ μειώνουν την σύνθεση των πρωτεογλυκανών, διαδικασίες που προσομοιάζουν τους μηχανισμούς της ενδοχόνδριας οστεοποίησης (Sandell and Aigner 2001) (Vornehm et al. 1996). Συνεπώς, παρόλο που τα χονδροκύτταρα αυξάνουν την συνολική αναβολική τους δραστηριότητα, μέσω αύξησης των αναβολικών συστατικών της ECM, οι καταβολικές διεργασίες υπερισχύουν και επέρχεται ο σταδιακός εκφυλισμός του χόνδρου.



**Εικόνα 7:** Η διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ αναβολικών και καταβολικών διεργασιών των χονδροκυττάρων οδηγεί στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου

Οι καταβολικές διεργασίες στον χόνδρο εξυπηρετούνται κυρίως μέσω πρωτεολυτικών ενζύμων, των μεταλλοπρωτεασών (MMPs). Τα ένζυμα αυτά συμμετέχουν σε διαδικασίες εξισορρόπησης των συστατικών της ECM υπό φυσιολογικές συνθήκες. Στην ΟΑ, η δράση των ενζύμων αυτών αυξάνεται και αυτό μπορεί να συμβαίνει είτε λόγω μείωσης των φυσικών αναστολέων τους (TIMPs), είτε μέσω επιγενετικών μηχανισμών, είτε μέσω μη ειδικής έκφρασης γονιδίων που σε φυσιολογικές συνθήκες δε θα εκφραζόταν στον χόνδρο (Chubinskaya, Kuettner, and Cole 1999). Η δράση της MMP-13 για παράδειγμα μπορεί να ρυθμιστεί από διάφορους παράγοντες που περιλαμβάνουν επιγενετικές τροποποιήσεις (miR-140, miR-146a), μεταγραφικούς παράγοντες, μετα-μεταγραφικές τροποποιήσεις μέσω των ncRNAs.

Επιπλέον, η διαταραχή της ομοιόστασης της άρθρωσης προκαλείται και από αλλαγές στην έκφραση αναβολικών παραγόντων και κυρίως από την μείωση της έκφρασης τους. Έχει φανεί ότι σε περιπτώσεις σκελετικών ασθενειών αναβολικοί παράγοντες όπως για παράδειγμα ο TGF- $\beta$  υπόκεινται στον έλεγχο διάφορων microRNAs και καταστέλλεται η έκφραση τους (Tommie C Simon and Jeffries 2017).

Τέλος, σημαντική φαίνεται να είναι η συμβολή του παράγοντα RUNX2 στον καταβολισμό της άρθρωσης. Φυσιολογικά ο Runx2 συμμετέχει στην διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, αλλά στον αρθρικό χόνδρο ρυθμίζει τη μεταγραφή γονιδίων που κωδικοποιούν για ένζυμα αποικοδόμησης της ECM, υποδηλώνοντας ότι ο Runx2 παίζει σημαντικό ρόλο στην υπερτροφία των χονδροκυττάρων και κατ' επέκταση την ανάπτυξη ασθενειών των οστών (Tommie C Simon and Jeffries 2017).

Όλες αυτές οι αλλαγές που συμβαίνουν στην μεταβολική δραστηριότητα των χονδροκυττάρων έχουν σοβαρό αντίκτυπο και στον φαινότυπο τους. Πιο συγκεκριμένα, τα ΟΑ χονδροκύτταρα υφίστανται δυναμική αλλαγή στα φαινοτυπικά τους χαρακτηριστικά που προσομοιάζουν τους ινοβλάστες. Ο νέος φαινότυπος επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό και από άλλους παράγοντες όπως τις ιντερλευκίνες, που είναι οι κύριοι διαμεσολαβητές της φλεγμονώδους αντίδρασης που συμβαίνει δευτερευόντως σε μια οστεοαρθρική άρθρωση. Το τελικό αποτέλεσμα όλων αυτών των διεργασιών είναι να επικρατεί ένας «καταβολικός» φαινότυπος των

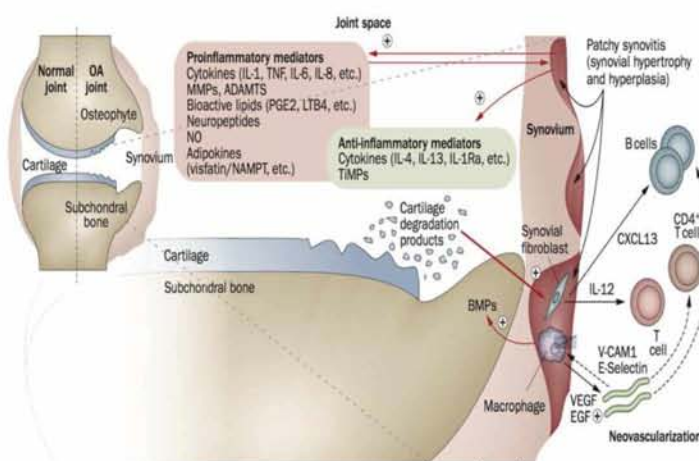


χονδροκυττάρων και να αποτυγχάνουν οι αναβολικές προσπάθειες(Aigner and McKenna 2002)(Ripmeester et al. 2018b) .

### A.9 Ο αρθρικός υμένας στην ΟΑ

Οι σύγχρονες απεικονιστικές μέθοδοι έχουν αποδείξει ότι η ΟΑ αποτελεί μια πολύπλοκη κατάσταση στην οποία προσβάλλονται όλες οι δομές της άρθρωσης(Ma et al. 2017).Εκτός από τον αρθρικό χόνδρο, ο οποίος έχει μελετηθεί εκτενώς για την συμμετοχή του στην ΟΑ, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει και ο αρθρικός υμένας, καθώς σε κάποιες περιπτώσεις πρώιμης εμφάνισης της ΟΑ και πριν ακόμη προκληθεί ο εκφυλισμός του αρθρικού χόνδρου, έχει εμφανίσει πολλές αλλαγές, όπως η πάχυνση του στρώματος επένδυσης του, παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών, διείσδυση του από μονοκύτταρα(Ma et al. 2017)(Fernandes, Martel-Pelletier, and Pelletier 2002).

Όπως προαναφέρθηκε, ο αρθρικός υμένας φυσιολογικά είναι ένας εξειδικευμένος συνδετικός ιστός, ο οποίος περιβάλλει τους τένοντες, ενώ στις αρθρώσεις είναι υπεύθυνος για την έκκριση του αρθρικού υγρού(Ma et al. 2017). Στην ΟΑ, ο αρθρικός υμένας υφίσταται αρκετές αλλαγές, με σημαντικότερη την διείσδυση του από μακροφάγα κύτταρα. Η διήθηση του από τα μακροφάγα οδηγεί στον σχηματισμό πολυπύρηνων γιγαντιαίων κυττάρων (MGCs), τα οποία εντείνουν την φαγοκυττάρωση στην περιοχή και ενεργοποιούν την παραγωγή φλεγμονωδών κυτοκινών. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την πυροδότηση του μονοπατιού της φλεγμονώδους αντίδρασης(Εικόνα 8)(Ma et al. 2017)(Gu et al. 2017)(Mathiessen and Conaghan 2017).Τα αρθρικά χονδροκύτταρα με την σειρά τους αντιδρούν και αυτά με την παραγωγή προ-φλεγμονωδών μεσολαβητών, οι οποίοι προσελκύουν ανοσοκύτταρα που αυξάνουν την αγγειογένεση και προκαλείται φαινοτυπική αλλαγή των χονδροκυττάρων(Mathiessen and Conaghan 2017).



**Εικόνα 8:** Απεικόνιση των φλεγμονωδών μηχανισμών που ενεργοποιούνται από τον αρθρικό υμένα και ενέχονται στην παθοφυσιολογία της ΟΑ.

Ακολουθεί ένας φαύλος κύκλος αντιδράσεων, καθώς τα χονδροκύτταρα παράγουν επιπρόσθετες κυτοκίνες και πρωτεολυτικά ένζυμα, αυξάνουν την υποβάθμιση του αρθρικού χόνδρου και προκαλούν περαιτέρω αρθρική φλεγμονή (Ma et al. 2017). Ωστόσο οι ακριβείς διαδικασίες που πυροδοτούν την φλεγμονή στην ΟΑ είναι πολύπλοκες και δεν έχουν αποσαφηνιστεί σε μεγάλο βαθμό. Δεδομένου ότι η ΟΑ σχετίζεται με την ηλικία, μια πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι ότι η φλεγμονή αποτελεί ανοσολογική απάντηση σε βλάβη ιστού. Επίσης ένας σοβαρός τραυματισμός των αρθρώσεων, μπορεί να ενεργοποιήσει την απελευθέρωση τοπικών φλεγμονωδών μεσολαβητών, ενώ υπάρχουν σοβαρές ενδείξεις ότι το μεταβολικό σύνδρομο και η παχυσαρκία αυξάνουν την συστηματική φλεγμονώδη αντίδραση μέσω φλεγμονωδών μεσολαβητών που μπορούν να συνεργάζονται με φλεγμονώδεις ουσίες που προέρχονται από τον μηχανισμό της ΟΑ (Mathiessen and Conaghan 2017).

Οι πιο καλά μελετημένες κυτοκίνες στην ΟΑ είναι η ιντερλευκίνη IL-1b, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου (TNF-a) και οι ιντερλευκίνες IL-6, IL-15, IL-17, IL-18. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν κυρίως η IL-1b και ο TNF-a καθώς έχει βρεθεί ότι η έκφραση τους αυξάνεται στο αρθρικό υγρό, στον υμένα, στον αρθρικό χόνδρο και στο υποχόνδριο οστό ασθενών με ΟΑ. Επιπλέον, τα μόρια αυτά συνεργάζονται και με άλλους παράγοντες που ασκούν καταβολική δράση στον χόνδρο και ενεργοποιούν οδούς σηματοδότησης που τελικά οδηγούν στον εκφυλισμό της άρθρωσης. Παρόλα αυτά τυχαιοποιημένες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με χορήγηση anti-TNF και αναστολέων της IL-1b σε ασθενείς με ΟΑ με σκοπό την μείωση του πόνου και της φλεγμονής δεν είχαν τα επιθυμητά αποτελέσματα (Fernandes et al. 2002).

#### **A.10 Επιγενετική στην ΟΑ**

Η ΟΑ αποτελεί, όπως προαναφέρθηκε, μια πολύπλοκη ασθένεια και η κατανόηση των παθογενετικών μηχανισμών της απαιτεί λεπτομερή εξέταση τόσο των κλινικών χαρακτηριστικών της, όσο και των μοριακών μηχανισμών που εμπλέκονται στην εμφάνισή της. Για τον λόγο αυτό η έρευνα έχει στραφεί τα τελευταία χρόνια προς την μελέτη των επιγενετικών μηχανισμών που συμμετέχουν στην εμφάνιση και την εξέλιξη του νοσήματος.

Ένας από τους πιο καλά μελετημένους μηχανισμούς της επιγενετικής ρύθμισης στην ΟΑ είναι η μεθυλίωση του DNA. Κατά την διαδικασία της

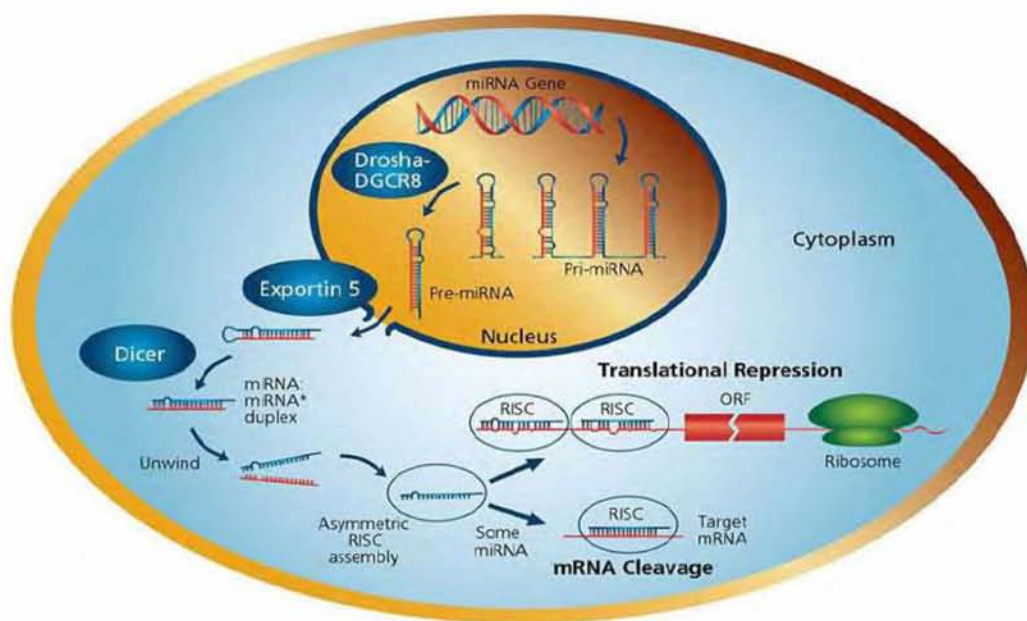
μεθυλίωσης του DNA, προστίθεται μια μεθυλομάδα στο πέμπτο άτομο άνθρακα του νουκλεοτιδίου της κυτοσίνης. Η διαδικασία αυτή καταλύεται από το ένζυμο μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs), ενώ η μεθυλίωση συμβαίνει κατά κύριο λόγο σε μια κυτοσίνη που βρίσκεται δίπλα από μια γουανίνη (CpG νησίδες γουανίνης κυτοσίνης). Η μεθυλίωση του DNA σχετίζεται στο σύνολο των περιπτώσεων με αποσιώπηση της έκφρασης των γονιδίων, ειδικά όταν αυτή συμβαίνει σε περιοχές των υποκινητών των γονιδίων (Carrió and Suelves 2015). Μεθυλίωση επίσης μπορεί να συμβεί και στις ιστόνες. Οι ιστόνες είναι πρωτεΐνες που συνδέονται με το DNA και συμμετέχουν στον σχηματισμό των νουκλεοσωμάτων. Η μεθυλίωση των ιστονών έχει ποικίλα αποτελέσματα ανάλογα με την θέση και την ιστόνη στην οποία συμβαίνει και έτσι μπορεί είτε να ενεργοποιεί την έκφραση των γονιδίων είτε να την αποσιωπά.

Ένας άλλος σημαντικός επιγενετικός μηχανισμός είναι η ακετυλίωση των ιστονών, ωστόσο η μέχρι σήμερα βιβλιογραφία δεν παρουσιάζει σαφείς αναφορές για την εμπλοκή της στην OA (Pick, Kilic, and Fierz 2014).

Οι περισσότερες μελέτες έχουν στραφεί στην διερεύνηση του ρόλου των μικρών μη κωδικών μορίων RNA (microRNAs) στην αιτιοπαθογένεια της νόσου. Όπως αναμένεται από τον πρωταρχικό τους ρόλο, την ρύθμιση κυτταρικών διαδικασιών, τα miRNAs έχει αποδειχθεί ότι συμμετέχουν σε όλες τις βιολογικές διεργασίες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου, την διατήρηση της ομοιόστασης της ECM, την διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, τη διαίρεση, την απόπτωση (Mirzamohammadi, Papaioannou, and Kobayashi 2014). Εφόσον η δράση των microRNAs σχετίζεται με τον φυσιολογικό φαινότυπο των χονδροκυττάρων, πιθανολογείται ότι η διαφοροποιημένη έκφρασή τους μπορεί να οδηγήσει σε παθολογικές καταστάσεις, όπως η οστεοαρθρίτιδα.

### A.11 Βιογένεση των miRNAs

Τα γονίδια από τα οποία προέρχονται τα microRNAs βρίσκονται είτε σε περιοχές του γονιδιώματος που δεν εμπεριέχουν γονίδια, είτε σε ιντρόνια ή εξώνια των γονιδίων που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες. Από τη μεταγραφή των γονιδίων των miRNAs που καταλύεται από την πολυμεράση II (PolII), αρχικά δημιουργείται το πρόωμο miRNA (pri-miRNA) το οποίο υπό τη δράση νουκλεασών μετατρέπεται σε πρόδρομο miRNA (pre-miRNA) και ακολούθως σε ώριμο miRNA, που αποτελεί και το λειτουργικό μόριο (Εικόνα 9) (O'Brien et al. 2018).



Εικόνα 9: Μηχανισμός βιογένεσης των miRNAs (O'Brien et al. 2018)

Τα pri-microRNAs που προκύπτουν από τη μεταγραφή είναι μεγέθους εκατοντάδων ή χιλιάδων νουκλεοτιδίων και φέρουν 5' καλύπτρα, poly (A) ουρά στο 3' άκρο τους και μια δομή φουρκέτας (Zhang, Ma, and Yao 2013). Αρχικά, επεξεργάζονται στον πυρήνα από ένα σύμπλοκο πρωτεϊνών που περιλαμβάνει την Drosha, μια ενδονουκλεάση τύπου RNase III και την Pasha, μια πρωτεΐνη που δεσμεύει δίκλωνο RNA η οποία κωδικοποιείται από την γονιδιακή περιοχή του συνδρόμου diGeorge (DGCR8). Η Pasha αναγνωρίζει τη δομή φουρκέτας του pri-microRNA και προσανατολίζει την Drosha, η οποία διασπά το μόριο RNA. Το προϊόν που προκύπτει διαθέτει δυο προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο και μια φωσφορική ομάδα στο 5' άκρο, ως αποτέλεσμα της ριβονουκλεοπρωτεϊνικής της δράσης και ονομάζεται pre-miRNA (O'Brien et al. 2018) (Macfarlane and Murphy 2010).

Ακολουθώς η εξπορτίνη-5 αναγνωρίζει δυο προεξέχοντα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο του pre-miRNA και το μεταφέρει από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα με δαπάνη ενέργειας που προέρχεται από την υδρόλυση του GTP. Στο κυτταρόπλασμα διασπάται σε μικρότερα κομμάτια (22nt) με τη βοήθεια της Dicer. Η Dicer είναι μια ενδονουκλεάση τύπου RNase III και έχει ως συμπαράγοντα τον TRBP. Το δίκλωνο μόριο που προκύπτει αποτελεί πλέον το ώριμο miRNA. Το ώριμο miRNA συνδέεται στο mRNA με τη βοήθεια του συμπλόκου αποσιώπησης RISC, το οποίο περιλαμβάνει την υποοικογένεια των πρωτεϊνών Argonaute(AGO), ως κύριο συστατικό που έχει ενδονουκλεολιτική δράση.

#### **A.12 Τρόπος δράσης miRNAs. Πλήρης και μερική συμπληρωματικότητα.**

Τα miRNAs ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση είτε μέσω παρεμπόδισης της μετάφρασης, είτε μέσω προώθησης της αποδόμησης των mRNAs-στόχων. Η μετα-μεταγραφική γονιδιακή σίγηση αρχίζει όταν ένα miRNA επιστρατεύει το σύμπλεγμα RISC (RNA-induced silencing complex, επαγόμενο από το RNA σύμπλοκο σίγησης), το οποίο συμβάλλει στην τοποθέτηση του miRNA επάνω στη συμπληρωματική αλληλουχία του mRNA-στόχου. Παρά την ύπαρξη εξαιρέσεων, η ειδικότητα της τοπικής στόχευσης εμπλέκει αλληλουχίες τόσο του miRNA όσο και του mRNA. Τα νουκλεοτίδια 2–8 του miRNA, που ονομάζονται περιοχή εκβλάστησης (seed region, SR), πρέπει να υβριδοποιούνται συνεχώς σε ένα τέλεια συμπληρωματικό τμήμα του mRNA στόχου. Οι θέσεις σύνδεσης για την περιοχή SR του miRNA βρίσκονται στην 3'-UTR του mRNA, και η συμπληρωματική αλληλουχία συνήθως επαναλαμβάνεται πολλές φορές μέσα σε αυτή την περιοχή. Το εάν ένα miRNA προωθεί την αποδόμηση ή καταστέλλει τη μετάφραση του mRNA-στόχου του εξαρτάται από το βαθμό συμπληρωματικότητας που εμφανίζει το miRNA προς το 3' άκρο του mRNA. Ειδικότερα, ο μηχανισμός σίγησης πιθανόν υπαγορεύεται από τον αριθμό, τον τύπο και τη θέση των αταίριαστων ζευγών βάσεων μεταξύ miRNA και mRNA. Με άλλα λόγια, αυτό που καθορίζει το τι ακριβώς θα συμβεί είναι ο βαθμός συμπληρωματικότητας της πρόσδεσης μεταξύ του mRNA και του miRNA. Έχει παρατηρηθεί ότι η πλήρης συμπληρωματικότητα, που συμβαίνει συχνότερα στα φυτά και όχι στα ζώα, έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή του mRNA. Αντίθετα οι αναντιστοιχίες (mismatches) ανάμεσα στις βάσεις που συμβαίνουν λόγω ελλιπούς συμπληρωματικότητας προάγουν την καταστολή της μετάφρασης.



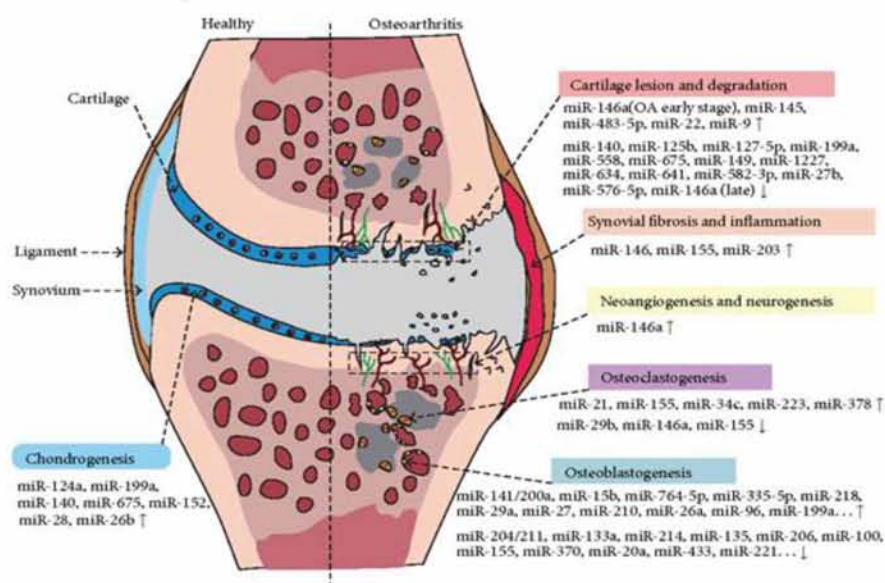
Τα miRNAs καταστέλλουν τη μετάφραση μέσω διαφόρων μηχανισμών είτε στο στάδιο της έναρξης, είτε στο στάδιο της επιμήκυνσης της μετάφρασης, ανάλογα με το πώς μετριάζουν την αλληλεπίδραση μεταξύ του 5' καλύμματος και της 3' πολυαδενυλιωμένης ουράς του mRNA. Παρά το γεγονός ότι ο ακριβής μηχανισμός δεν είναι ακόμη καλά κατανοητός, η καταστολή της μετάφρασης περιλαμβάνει κυτταροπλασματικούς σχηματισμούς επεξεργασίας των mRNA, τα σωμάτια P (P-bodies). Αυτά πιστεύεται ότι διαδραματίζουν ένα ρόλο στη σίγηση των mRNA επειδή τα mRNA-στόχοι και τα συστατικά του RISC συν-εντοπίζονται σε αυτές τις περιοχές του κυττάρου. Τα P-bodies «φιλοξενούν» πολλές πρωτεΐνες που ελέγχουν τα σύμπλοκα των αγγελιαφόρων ριβονουκλεοπρωτεϊνών (messenger ribonucleoprotein, mRNP-complexes). Τα εν λόγω σύμπλοκα αποτελούνται από mRNA και πρωτεΐνες-καταστολείς αλλά όχι από παράγοντες έναρξης της μετάφρασης. Έτσι, η τοπολογία των mRNAs-στόχων και επάνω στα P-bodies, και επομένως ο σχηματισμός των συμπλόκων mRNPs, παρεμποδίζουν τη μετάφραση. Παρά το γεγονός ότι η καταστολή της μετάφρασης φαίνεται να είναι η κύρια δράση κατά τη σίγηση, η αποδόμηση του mRNA είναι επίσης σημαντική και συμβαίνει όταν η αλληλουχία του miRNA πέρα από την περιοχή SR παρουσιάζει τέλεια συμπληρωματικότητα με την υπόλοιπη 3'UTR του mRNA. Η αποδόμηση αυτή περιλαμβάνει αποαδενυλίωση, αφαίρεση του καλύμματος και εξωνουκλεολυτική πέψη του mRNA-στόχου. Ωστόσο, ο ακριβής μηχανισμός της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι άγνωστος.

### **A.13miRNAs και OA**

Μελέτες των τελευταίων δεκαετιών έχουν αναδείξει το ρόλο των miRNAs στη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία του αρθρικού χόνδρου, πολλά εκ των οποίων παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στον οστεοαρθρικό χόνδρο, συμμετέχοντας στην παθογένεια της νόσου(Le, Swingler, and Clark 2013)(Le et al. 2013). Η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs αλλάζει την ομοιοστασία του αρθρικού χόνδρου καθώς διαταράσσεται η ισορροπία μεταξύ αναβολικών και καταβολικών διεργασιών των χονδροκυττάρων, συμβάλλοντας στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου. Επιπλέον, κύριες διαδικασίες που συμβάλλουν στην αιτιοπαθογένεια της νόσου, όπως η φλεγμονή, η απόπτωση και η αυτοφαγία, ρυθμίζονται από τα miRNAs που παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση στην OA, ενισχύοντας περαιτέρω την εμπλοκή τους στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου(Εικόνα 10).

Μελέτες έχουν αναδείξει πολλά διαφορετικά miRNAs (όπως πχ τα miR-140, miR-9, miR-145, miR-455, miR-675 κ.α) να εμπλέκονται τόσο στη φυσιολογική διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων όσο και στην παθογένεια της OA (Wu et al. 2014). Μεταξύ αυτών, το καλύτερα μελετημένο miRNA που εκφράζεται στον αρθρικό χόνδρο και παρουσιάζει διαφοροποιημένη έκφραση στην OA είναι το miR-140. Επίσης διαφοροποιημένη έκφραση στην οστεοαρθρική άρθρωση παρουσιάζουν και miRNAs, όπως το miR-146a, miR-22, miR-27a και miR-27b, που ρυθμίζουν σημαντικά μονοπάτια της φλεγμονής συμπεριλαμβανομένου των TLRs και των ιντερλευκινών (Yu et al. 2015).

Παρόλο που τις τελευταίες δεκαετίες πληθώρα μελετών προτείνουν το ρόλο των επιγενετικών μηχανισμών και συγκεκριμένα των miRNAs στην παθογένεια εκφυλιστικών νόσων όπως η OA, απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση των πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων των miRNAs με μονοπάτια που ενέχονται στην αποδόμηση του χόνδρου. Η πλήρης κατανόηση του μοριακού μηχανισμού μέσω του οποίου τα miRNAs απορυθμίζονται αλλά και των διαδικασιών που απορυθμίζουν, θα συμβάλει στην κατανόηση της μοριακής βάσης της OA, αναδεικνύοντας νέες στρατηγικές για τη θεραπεία ασθενών με OA.



**Εικόνα 10:** miRNAs που παρουσιάζουν διαφοροποιημένη έκφραση μεταξύ φυσιολογικής και οστεοαρθρικής άρθρωσης (Yu et al. 2015)

#### A.14miR-140 και ΟΑ

Το καλύτερο μελετημένο miRNA που εκφράζεται στον αρθρικό χόνδρο είναι το miR-140. Το γονίδιο του miR-140 βρίσκεται μεταξύ των εξωνίων 16 και 17 του γονιδίου *Wwp2*, που κωδικοποιεί την πρωτεϊνική λιγάση E3 της ουβικουτίνης, και εντοπίζεται στο χρωμόσωμα 16 του ανθρώπινου γονιδιώματος (Tuddenham et al. 2006). Το miR-140 έχει αποδειχθεί ότι ρυθμίζει την έκφραση μορίων, όπως των BMPs, του μεταγραφικού παράγοντα SOX9, και του αυξητικού παράγοντα TGF- $\beta$ , που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων, αναδεικνύοντας το ρόλο του στη διαδικασία της χονδρογένεσης και κατ' επέκταση της ενδοχόνδριας οστεοποίησης. Επιπροσθέτως, το miR-140 είναι απαραίτητο για τη φυσιολογική ανάπτυξη του αρθρικού χόνδρου, καθώς ρυθμίζει την έκφραση της αποακετυλάσης των ιστονών 4 (HDAC4) (Tuddenham et al. 2006) που δρα ως αναστολέας του RUNX-2 και του γονιδίου Smad-3 που συμμετέχει στην ανάπτυξη των οστών κατά την ενδοχόνδρια οστεοποίηση (Tuddenham et al. 2006). Επιπλέον σε *in vivo* μελέτες, ποντίκια που είχαν υποστεί απαλοιφή του γονιδίου miR-140 παρουσίασαν αύξηση της πρωτεΐνης Dnrep που δρα ως ανταγωνιστής του σηματοδοτικού μονοπατιού των BMPs, επιβεβαιώνοντας το βασικό ρόλο του miR-140 στον έλεγχο της δράσης των αυξητικών παραγόντων που συμμετέχουν στη διαφοροποίηση των χονδροκυττάρων (Tuddenham et al. 2006). Οι αυξητικοί παράγοντες θεωρούνται μόρια απαραίτητα για την ακεραιότητα του ώριμου αρθρικού χόνδρου καθώς η εξωκυττάρια ουσία του ενήλικου χόνδρου υφίσταται αναδιαμόρφωση μέσω της δράσης καταβολικών ενζύμων που αποικοδομούν την θεμέλια ουσία και η ισορροπία επέρχεται μέσω της παραγωγής πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας που συντίθενται από αναβολικά σήματα.

Μελέτες σύγκρισης των επιπέδων έκφρασης διαφόρων miRNAs μεταξύ ΟΑ ασθενών και φυσιολογικών ατόμων ανέδειξαν πως το miR-140 παρουσιάζει μειωμένη έκφραση στα οστεοαρθρικά χονδροκύτταρα σε σχέση με τα φυσιολογικά (Iliopoulos et al. 2008) (Yang et al. 2011). Η μειωμένη έκφραση του miR-140 έχει συσχετισθεί άμεσα με την αυξημένη έκφραση του ενζύμου ADAMTS-5 (Araldi and Schipani 2010) ενώ *in vivo* μελέτες επιβεβαίωσαν ότι η ADAMTS-5 αποτελεί άμεσο στόχο του miR-140, εφόσον ποντίκια τα οποία είχαν υποστεί απαλοιφή του γονιδίου miR-140 (miR-140<sup>-/-</sup> ποντίκια) εμφάνισαν αλλαγές στο χόνδρο που προσομοιάζουν αυτές του οστεοαρθρικού αρθρικού χόνδρου. Η μείωση των πρωτεογλυκανών και ο σχηματισμός ινώδους χόνδρου συσχετίστηκε με τα αυξημένα επίπεδα της ADAMTS-



5 λόγω της μη αποδόμησης της από το miR-140. Αντίθετα, τα διαγονιδιακά ποντίκια που υπερέκφραζαν το miR-140 στον χόνδρο, αύξησαν τη σύνθεση των πρωτεϊνών της εξωκυττάριας ουσίας με παράλληλη μείωση των επιπέδων της ADAMTS-5, αποδεικνύοντας τα ανθεκτικά στην εκδήλωση OA(Miyaki et al. 2010a). Εκτός από την ADAMTS-5, το miR-140 ρυθμίζει την έκφραση του IGFBP-5 και της MMP-13, μόρια τα οποία συμμετέχουν στην ομοιοστασία των χονδροκυττάρων και ενέχονται στην αιτιοπαθογένεια της OA (Tardif et al. 2009b)(Liang et al. 2012).

#### **A.15.miR-146a και OA**

Παρόλο που η OA εθεωρείτο ως μη- φλεγμονώδης νόσος, τα τελευταία χρόνια παρέχονται ισχυρές ενδείξεις για τη συμμετοχή της φλεγμονής του υμένα (υμενίτιδα) αλλά και ολόκληρης της άρθρωσης στην παθογένεια της OA(Sokolove and Lepus 2013).Το miR-146a ανήκει στην κατηγορία των miRNAs που συμμετέχουν στη ρύθμιση παραγόντων της φλεγμονής και παρουσιάζει διαφοροποιημένη έκφραση στον OA χόνδρο χωρίς ωστόσο να είναι πλήρως διευκρινισμένος ο ρόλος του στην αιτιοπαθογένεια της νόσου.

Ο Li και οι συν. έδειξαν πως τα επίπεδα έκφρασης του miR-146a σε μια OA άρθρωση σχετίζονται με το βαθμό των φλεγμονωδών αποκρίσεων που προέρχονται από τον πάσχοντα αρθρικό χόνδρο και κυρίως από τον αρθρικό υμένα, με σκοπό την ανακούφιση των συμπτωμάτων του πόνου (X. Li et al. 2011). Η έκφραση του miR-146a έχει συσχετιστεί με το βαθμό αλλοίωσης μιας OA άρθρωσης, καθώς παρατηρούνται υψηλά επίπεδα έκφρασης του στα αρχικά στάδια της OA, ενώ μειώνεται η έκφραση του με τη σταδιακή αποδόμηση του χόνδρου σε προχωρημένη OA(Jones et al. 2009)(Yamasaki et al. 2009). Επίσης, μελέτες έχουν δείξει την υποχώρηση των διαδικασιών που ενεργοποιούνται από τον TNFα και το σηματοδοτικό μονοπάτι TLR/IL μετά από αύξηση της έκφρασης του miR-146a στα OA χονδροκύτταρα(Jones et al. 2009)(Sonkoly and Pivarcsi 2009)(Taganov et al. 2006), αναδεικνύοντας το ρόλο του miR-146a ως αναστολέα της φλεγμονής στην OA. Συγκεκριμένα, το miR-146ασυμμετέχει στις φλεγμονώδεις αποκρίσεις, καθώς ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση δύο βασικών μορίων του μονοπατιού ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB,την κινάση που σχετίζεται με τον υποδοχέα της IL-1b (IRAK-1) και τον παράγονταTRAF-6. Η ενεργοποίηση του NF-kBκαι η μεταφορά του στον πυρήνα των κυττάρων οδηγεί σε επαγωγή της έκφρασης των

γονιδίων που σχετίζονται με τη φλεγμονή, συμπεριλαμβανομένων την IL-1b, IL-6, IL-8 και τον παράγοντα νέκρωσης των όγκων, TNF-a(Wang et al. 2013).

Εκτός της συμμετοχής του miR-146a στις διαδικασίες της φλεγμονής, έχειδειχτεί πως το miR-146α ρυθμίζει την έκφραση καταβολικών ενζύμων, όπως των MMP-13 και ADAMTS-5, είτε στοχεύοντας άμεσα στο mRNA των παραπάνω γονιδίων, είτε τροποποιώντας την έκφραση μορίων που συμμετέχουν στα σηματοδοτικά μονοπάτια, τα οποία επάγουν την έκφραση των παραπάνω μορίων(Jones et al. 2009)(Yamasaki et al. 2009)(Taganov et al. 2006)

### A.16 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη του συνεργιστικού ρόλου των miR-140 και miR-146a στην αιτιοπαθογένεια της ΟΑ, μέσω προσδιορισμού των διαδικασιών στις οποίες συμμετέχουν τα ανωτέρω miRNAs στους ΟΑ ιστούς και συμβάλλουν στην εξέλιξη της νόσου.

Για το σκοπό αυτό:

- ✓ Διερευνήθηκε η έκφραση των miR-140 και miR-146a σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα και σε κύτταρα υμένα
- ✓ Πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων-στόχων του miR-140 και miR-146a αλλά των σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν τα γονίδια-στόχοι
- ✓ Διερευνήθηκε ο ρόλος των miR-140 και miR-146a στη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων-στόχων τους (TLR-4, IRAK-1 και TRAF-6) αλλά και γονιδίων που ενέχονται στην αιτιοπαθογένεια της ΟΑ (ADAMTS-5, MMP-13, IL-6, IL-1β και TNFα) μετά από χορήγηση miR-140 ή/και miR-146a σε καλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων και κυττάρων υμένα.

## **Β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## **B.1 Υλικά και Μέθοδοι**

### **B.1.1 Συλλογή δειγμάτων**

Στην συγκεκριμένη διπλωματική εργασία μελετήθηκαν δείγματα αρθρικού χόνδρου και αρθρικού υμένα τα οποία ελήφθησαν από ασθενείς με πρωτοπαθή ΟΑ που υπέστησαν ολική αρθροπλαστική γόνατος στην Ορθοπαιδική Κλινική του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Λάρισας. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 20 δείγματα ασθενών (1 άνδρας και 19 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας  $67.7 \pm 6.9$ ). Ασθενείς με ρευματοειδή αρθρίτιδα ή αρθρίτιδα στα πλαίσια άλλου αυτοάνοσου νοσήματος, καθώς και χονδροδυσπλασία, σηπτική ΟΑ και μετα-τραυματική ΟΑ αποκλείστηκαν από τη μελέτη. Την ομάδα ελέγχου αποτέλεσαν 10 άτομα (4 άνδρες και 6 γυναίκες, με μέσο όρο ηλικίας  $57.9 \pm 9.2$ ), χωρίς ιστορικό πάθησης των αρθρώσεων, τα οποία είχαν υποστεί χειρουργική επέμβαση επανόρθωσης κατάγματος ή ακρωτηριασμό. Τα χονδροκύτταρα απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν από τμήμα του εκφυλισμένου αρθρικού χόνδρου, ενώ τα υμενοκύτταρα απομονώθηκαν από τον υμένα, ο οποίος στις περισσότερες των περιπτώσεων είχε διηθηθεί από λιπώδη ιστό.

### **B.1.2 Καλλιέργεια χονδροκυττάρων και κυττάρων υμένα**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- ✓ Συλλογή δειγμάτων από το χειρουργείο και
- ✓ Διατήρηση των ιστών σε φυσιολογικό ορό μέχρι την διαδικασία απομόνωσης κυττάρων.
- ✓ Παραλαβή αρθρικού χόνδρου και υμένα με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού και μεταφορά τους σε πλάκα των 6 οπών.
- ✓ Επώαση με το ένζυμο προνάση (Pronase, Roche) σε συγκέντρωση 5mg/ml σε 2ml/well πλήρους θρεπτικού (DMEMF12, 10%FBS, 5%antibiotics) υλικού για 30 λεπτά (συνθήκες:  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$  σε κλίβανο).
- ✓ Απομάκρυνση της προνάσης και θρεπτικού υλικού προσεκτικά.
- ✓ Επώαση των θραυσμάτων με το ένζυμο κολλαγενάση σε συγκέντρωση 5mg/ml σε 2ml/well πλήρους θρεπτικού υλικού στον κλίβανο.
- ✓ Μεταφορά του περιεχομένου των sixwells σε σωληνάρια των 15 ml, φυγοκέντρωση στις 1800 rpm για 10min στους  $25^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Αφαίρεση του υπερκείμενου, διάλυση του ιζήματος σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS 1X και εκ νέου φυγοκέντρωση στις ίδιες συνθήκες.

- ✓ Εκ νέου διάλυση του ιζήματος σε πλήρες θρεπτικό υλικό, προσθήκη των κυττάρων σε φλάσκες των 25 cm<sup>3</sup>, συμπλήρωμα πλήρους θρεπτικού υλικού μέχρι τελικού όγκου 5ml/φλάσκα και επώαση στον κλίβανο (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

### **B.1.3 Αποκόλληση κυττάρων με θρυψίνη**

Η θρυψινοποίηση είναι μια απαραίτητη διαδικασία και χρησιμοποιείται κυρίως σε περιπτώσεις ανακαλλιέργειας των κυττάρων. Για να μπορέσει να επιτευχθεί η θρυψινοποίηση και συνεπώς η αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες είναι απαραίτητο η ανάπτυξη των κυττάρων να φτάνει στο 90-100%. Αναλυτικά τα στάδια της θρυψινοποίησης είναι τα εξής:

- ✓ Παρατήρηση κυττάρων στο μικροσκόπιο για έλεγχο πληρότητας της επιφάνειας της φλάσκας και της μορφολογίας των κυττάρων.
- ✓ Απομάκρυνση καλλιεργητικού υλικού.
- ✓ Ξέπλυμα κυττάρων με PBS 1X.
- ✓ Προσθήκη 1 ml θρυψίνης σε κάθε φλάσκα.
- ✓ Τοποθέτηση στον κλίβανο για 5'-10'.
- ✓ Παρατήρηση της μορφολογίας των κυττάρων στο μικροσκόπιο ύστερα από τη δράση της θρυψίνης.
- ✓ Υποβοηθούμενη αποκόλληση των κυττάρων με ήπιο χτύπημα της φλάσκας δεξιά αριστερά.
- ✓ Προσθήκη 5mlπλήρους θρεπτικού υλικού για να σταματήσει η δράση της θρυψίνης.
- ✓ Μεταφορά υλικού σε falcon των 15 mlκαι φυγοκέντρωση στις 1800 rpm για 10min στους 25°C.
- ✓ Απομάκρυνση υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος κυττάρων σε 5 mlPBSX1
- ✓ Φυγοκέντρωση στις 1800 rpm για 10min στους 25°Cκαι απομάκρυνση υπερκειμένου
- ✓ Το ιζήμα κυττάρων θα μπορούσε να ανακαλλιεργηθεί, να καταψυχθεί για μελλοντική χρήση ή να χρησιμοποιηθεί για απομόνωση DNA, RNAκαι πρωτεΐνης.

### **B.1.4 Πάγωμα κυττάρων**

- ✓ Θρυψινοποίηση κυττάρων για την παραλαβή των κυττάρων σε μορφή ιζήματος
- ✓ Επαναδιάλυση του ιζήματος κυττάρων σε κατάλληλο υλικό που επιτρέπει την ψύξη το οποίο περιέχει:
- ✓ 60% θρεπτικό σκέτο
- ✓ 30% FBS
- ✓ 10% DMSO
- ✓ Μεταφορά κυττάρων σε ειδικά φιαλίδια κρυοσυντήρησης.
- ✓ Σταδιακή κατάψυξη των κυττάρων αρχικά σε θερμοκρασία  $-20^{\circ}\text{C}$  για 3 ώρες.
- ✓ Μεταφορά τους σε θερμοκρασία  $-80^{\circ}\text{C}$  και φύλαξη για μερικές ημέρες.
- ✓ Αποθήκευση στους  $-150^{\circ}\text{C}$  μέχρι την χρήση τους .

#### **B.1.5 Απομόνωση ολικού mRNA**

Η απομόνωση του ολικού RNA από τα χονδροκύτταρα και τα κύτταρα υμένα πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εμπορικού kit RNeasy spin purification kit της εταιρείας BIORON. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής :

- ✓ Διάλυση ιζημάτων κυττάρων που ελήφθη από τη θρυψινοποίηση σε 1ml διαλύματος τύπου Trizol και μεταφορά σε φυαλίδια των 2 ml.
- ✓ Έντονη ανάδευση
- ✓ Διατήρηση δειγμάτων για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Προσθήκη 200μl χλωροφορμίου και ανάδευση με έντονο vortex.
- ✓ Διατήρηση δειγμάτων για 3-10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Φυγοκέντρηση δειγμάτων για 15 λεπτά στις 12000rpm , στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Μεταφορά υπερκείμενης φάσης όπου βρίσκεται το RNA σε καινούριο φυαλίδιο
- ✓ Προσθήκη 500μl ισοπροπανόλης.
- ✓ Επώαση για 10 λεπτά στον πάγο.
- ✓ Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12000 rpm , στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Αφαίρεση υπερκείμενου και
- ✓ Προσθήκη 500μl 75% αιθανόλης
- ✓ Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, στις 10000rpm , στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Αφαίρεση υπερκείμενου και μεταφορά των εppendorfs στον κλίβανο μέχρις ότου στεγνώσουν καλά.
- ✓ Προσθήκη 30μl  $\text{dH}_2\text{O}$  / φυαλίδιο για τη διάλυση του
- ✓ Επώαση του RNA στους  $55^{\circ}\text{C}$ - $60^{\circ}\text{C}$  σε υδατόλουτρο για 10 λεπτά.

- ✓ Ανάδευση και αποθήκευσή τους στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη χρήση τους.

### **B.1.6 Σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA).**

Μετά την απομόνωση του RNA από χονδροκύτταρα και κύτταρα υμένα ακολούθησε η σύνθεση συμπληρωματικού DNA (cDNA). Η μέθοδος που ακολούθηθηκε ονομάζεται μέθοδος της αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcription). Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε δυο στάδια, ενώ το κύριο ένζυμο της διαδικασίας ήταν η αντίστροφη μεταγραφάση MMLV (Moloney Murin Leukemia Virus reverse transcriptase 200 U/μl). Οι ποσότητες των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση της αντίδρασης κάθε δείγματος αναγράφονται παρακάτω:

#### **1<sup>ο</sup> στάδιο**

Random primers : 1μl

dNTPs : 1μl

dH<sub>2</sub>O : 11,5μl

RNA : 1,5μl

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ήταν η εξής:

Stage1:  $65^{\circ}\text{C}$ , 5 λεπτά

Stage2:  $4^{\circ}\text{C}$ , for ever

#### **2<sup>ο</sup> στάδιο**

5Xbuffer : 4μl

DTT : 2μl

MMLV : 0,5 μl

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε η αντίδραση ήταν η εξής:

Stage1:  $37^{\circ}\text{C}$ , 2 λεπτά

Stage2:  $25^{\circ}\text{C}$ , 10 λεπτά

Stage3:  $37^{\circ}\text{C}$ , 50 λεπτά

Stage4:  $70^{\circ}\text{C}$ , 15 λεπτά

Stage5:  $4^{\circ}\text{C}$ , for ever

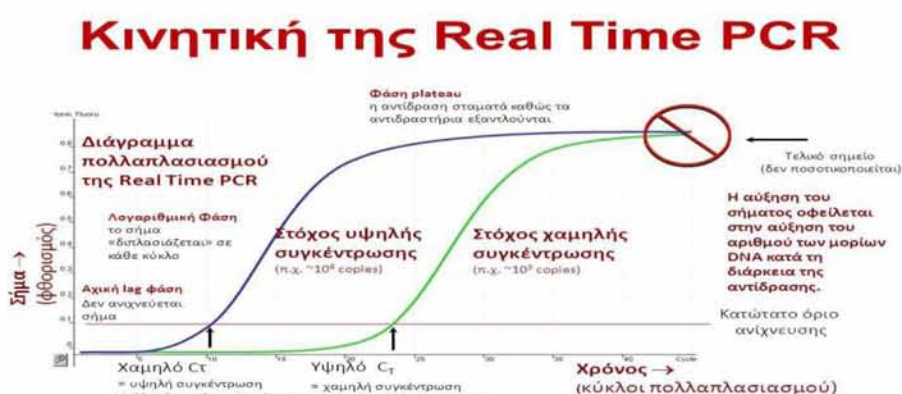


### B.1.7. Ποσοτική αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Quantitative real-time PCR, qRT-PCR).

Η qRT-PCR είναι μια διαδικασία η οποία βρίσκει μεγάλη εφαρμογή στην Μοριακή Βιολογία καθώς σε σύντομο χρονικό διάστημα και με σχετικά χαμηλό κόστος προσδιορίζει την έκφραση γονιδίων σε μεταγραφικό επίπεδο. Επιπλέον, η qRT-PCR επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ενός αρκετά μεγάλου αριθμού δειγμάτων με μεγάλη ευαισθησία και σχετικά μικρή συχνότητα επιμόλυνσης. Άλλα σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι επίσης το μεγάλο εύρος των μετρήσεων, η εύκολη επαναληψιμότητα και ο ποσοτικός προσδιορισμός των μορίων RNA.

#### Αρχή της qRT-PCR

Είναι η διαδικασία κατά την οποία ενισχύεται μια αλληλουχία DNA με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, ενώ συγχρόνως ανιχνεύεται το παραγόμενο προϊόν σε πραγματικό χρόνο σε σημείο όπου η αντίδραση βρίσκεται ακόμη σε εκθετική φάση χρησιμοποιώντας ειδικές φθορίζουσες χρωστικές που προσδένονται στην αλληλουχία που ενισχύεται. Πιο συγκεκριμένα, ο φθορισμός καθορίζεται στο τέλος κάθε κύκλου της PCR με αποτέλεσμα να δημιουργείται μια καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot). Επίσης η αύξηση του σήματος φθορισμού είναι ανάλογη του νεοσυντιθέμενου προϊόντος και υπάρχει άμεση συσχέτιση με την ποσότητα του αρχικού υποστρώματος. Η καμπύλη ενίσχυσης χωρίζεται σε τρεις φάσεις (εικόνα 11): την εκθετική, την γραμμική και την φάση κορεσμού. Στην εκθετική φάση στον κάθε κύκλο της αντίδρασης διπλασιάζεται με ακρίβεια το προϊόν επειδή τα απαραίτητα συστατικά (π.χ. dNTPs, εκκινητές, πολυμεράση) για να γίνει η αντίδραση υπάρχουν σε πλεόνασμα. Την εκθετική φάση διαδέχεται η γραμμική όταν κάποια από τα αντιδραστήρια πλέον έχουν εξαντληθεί ενώ ταυτόχρονα αρχίζουν να συσσωρεύονται παραπροϊόντα και αναστολείς. Η φάση κορεσμού ή το σημείο κορεσμού επέρχεται όταν τελικά σταματήσει εντελώς η παραγωγή του προϊόντος.



**Εικόνα 11:** Γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού που προκύπτει κατά την Real-time PCR

Μια άλλη καμπύλη που χρησιμοποιείται για να καθορίσει την ειδικότητα του προϊόντος είναι η καμπύλη τήξης ή αποδιάταξης. Για την δημιουργία της καμπύλης αυτή μετράτε ο φθορισμός που ανιχνεύεται όταν η θερμοκρασία αυξάνεται προοδευτικά πάνω από τη θερμοκρασία τήξεως του συντιθέμενου μορίου. Αυτό βασίζεται στο γεγονός ότι η θερμοκρασία αυτή είναι άμεσα συνδεδεμένη με την νουκλεοτιδική σύσταση με αποτέλεσμα να μπορεί να ταυτοποιείται το σήμα που εκπέμπεται με το σωστό προϊόν.

Στην παρούσα εργασία η ανίχνευση του παραγόμενου προϊόντος της αντίδρασης έγινε με χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBRGREEN, που συνδέεται αποκλειστικά σε δίκλιωνα μόρια DNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των γονιδίων φαίνονται στον πίνακα 1.

Το διάλυμα της αντίδρασης (mix) κάθε δείγματος για τον προσδιορισμό της γονιδιακής έκφρασης σε μεταγραφικό επίπεδο εμπεριείχε:

cDNA:	2 μl
SYBRGreen:	12 μl
Εκκινητές forward:	1 μl
Εκκινητές reverse:	1 μl
Απεσταγμένο νερό:	4 μl

Η PCR πραγματοποιήθηκε στις εξής συνθήκες:

Αρχικά τα μόρια αποδιατάσσονται στους 95°C για 10 λεπτά.

- ✓ 40 κύκλοι στους οποίους ενισχύεται η αλληλουχία στόχος σε 3 στάδια:
  - Αποδιάταξη στους 95°C για 30 δεύτερα
  - Υβριδοποίηση των εκκινητών στη θερμοκρασία του σημείου τήξης για κάθε εκκινητή για 30 δεύτερα
  - Επιμήκυνση στους 72°C για 15 δεύτερα
- ✓ Τελική επιμήκυνση στους 72°C για 10 λεπτά

Πίνακας 1: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη real-timePCR

Γονίδιο	Αλληλουχία Forward εκκινητή	Αλληλουχία Reverse εκκινητή
<b>TLR-4</b>	TATGGTCCAGGAGCTGGAGA	TGACATAAAGATCCCAACTAGACAA
<b>IRAK-1</b>	CAGGCTGGAGTGACATCATA	AGACCCTGTCTCTGCCAAAA
<b>TRAF-6</b>	GCAACAAGGCGGTAGTGATT	TGTTGCAGCAGGTATTTTGC
<b>MMP-13</b>	TGGCATTGCTGACATCATGA	GCCAGAGGGCCCATCAA
<b>ADAMTS-5</b>	CAGCAGTGCAACCTGACATT	CAGATTCTCCCCTTTCCACA
<b>IL-6</b>	ATGCAATAACCACCCCT	TAAGGAGCATGCTACA
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	TTCTGCTTGAGAGGTGCTGA	GGGCCTCAAGGAAAAGAATC
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	CCCTGAAAACAACCCTC	AAGAGGCTGAGGAACAA
<b>GAPDH</b>	GAGTCAACGGATTTGGTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG

#### Κανονικοποίηση-Επιλογή εσωτερικού μάρτυρα.

Για την διόρθωση τυχόν διακυμάνσεων που μπορεί να προκύψουν κατά την διαδικασία της ποσοτικοποίησης των αποτελεσμάτων είναι απαραίτητος ο ταυτόχρονος πολλαπλασιασμός ενός εσωτερικού μάρτυρα ως προς τον οποίον θα κανονικοποιηθεί το δείγμα όπως προαναφέρθηκε.

Τα χαρακτηριστικά που πρέπει να πληροί ο κατάλληλος εσωτερικός μάρτυρας είναι τα εξής:

- ✓ Η έκφραση του πρέπει να διατηρείται αμετάβλητη μεταξύ των ιστών και σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια ενός οργανισμού.
- ✓ Να μην επηρεάζεται από τον χειρισμό του πειράματος.
- ✓ Θα πρέπει να έχει αδρή έκφραση στο ίδιο επίπεδο με το γονίδιο που εξετάζεται.

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι εσωτερικοί μάρτυρες είναι η β-ακτίνη, το ριβοσωμικό RNA, η δεϋδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH) και άλλα. Τα πειράματα της παρούσας διπλωματικής πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ως εσωτερικού μάρτυρα της δεϋδρογονάσης της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεϋδης (GAPDH).

### **Ποσοτικοποίηση αποτελεσμάτων –γραφική παράσταση πολλαπλασιασμού.**

Κατά τους πρώτους κύκλους της PCR εμφανίζεται μια αλλαγή στο σήμα φθορισμού, η οποία αποτελεί τον βασικό φθορισμό (baseline). Η τιμή του φθορισμού που καταγράφεται στο τέλος του κάθε κύκλου αποτελεί το ποσό του προϊόντος μέχρι εκείνο το στάδιο της αντίδρασης. Όσο περισσότερο είναι το αρχικό ποσό του μορίου στόχου κατά την έναρξη της αντίδρασης, τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων που απαιτούνται προκειμένου να φτάσει η αντίδραση στο σημείο εκείνο όπου το σήμα φθορισμού καταγράφεται για πρώτη φορά ως στατιστικά σημαντικό σε σχέση με το αρχικό στάδιο βασικού φθορισμού. Το σημείο αυτό καλείται threshold cycle ή Ct.

Για την ποσοτικοποίηση του αποτελέσματος της αντίδρασης πραγματοποιείται απόλυτη ή σχετική ποσοτικοποίηση ανάλογα με τα πειραματικά ζητούμενα και δεδομένα. Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση είναι απαραίτητο να είναι γνωστός ο ακριβής αριθμός των αντιγράφων του RNA στόχου και τα αποτελέσματα εξάγονται με τη βοήθεια της απόλυτης πρότυπης καμπύλης.

Στη σχετική ποσοτικοποίηση υπολογίζεται η έκφραση ενός γονιδίου σε σχέση με ένα γονίδιο αναφοράς.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος ct για τους εξής λόγους:

- ✓ Είναι βασισμένη σε μαθηματικό τύπο.
- ✓ Η ποσότητα του μορίου στόχου κανονικοποιείται ως προς έναν εσωτερικό μάρτυρα σε σχέση με ένα μόριο ρυθμιστή σύμφωνα με τον τύπο  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .
- ✓ Αποφεύγεται η αραίωση των δειγμάτων και συνεπώς τυχόν λάθη που μπορούν να προκύψουν από αυτήν.
- ✓ Εξοικονομείται περισσότερος χώρος στο platetης realtimePCR για μελέτη ακόμη περισσότερων δειγμάτων.

### **B.1.8 Χορήγηση mimic miR-140 και miR-146a σε κυτταροκαλιέργειες χονδροκυττάρων και κυττάρων υμένα**

**Η Τεχνολογία του RNAi.** Η παρεμβολή του RNA ή RNA όπως αποκαλείται, είναι το φαινόμενο που προκαλεί τη μετά-μεταγραφική σίγαση ενός γονιδίου μετά από ενδογενή παραγωγή ή από εισαγωγή στο κύτταρο ενός μικρού μοριακά παρεμβατικού RNA (small interfering RNA - siRNA) με αλληλουχία συμπληρωματική με αυτή του γονιδίου. Το φαινόμενο της σίγασης ενός γονιδίου μέσω του RNAi ανακαλύφτηκε αρχικά στον νηματοειδή σκώληκα *C. Elegans* από τους Fire και Melo το 1998. Αποτελεί έναν φυσικό, αρχέγονο αμυντικό μηχανισμό με τον οποίο τα φυτά και τα κατώτερα σπονδυλωτά καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων όταν απαντώνται στο κύτταρο δίκλωνα μόρια RNA της ίδιας αλληλουχίας. Πιθανόν είναι αποτέλεσμα εξελικτικών μηχανισμών για την καταπολέμηση ιικών λοιμώξεων και μεμονωμένων γενετικών στοιχείων τα οποία εξαπλώνονται χρησιμοποιώντας ως γενετικό υλικό δίκλωνο RNA (dsRNA). Ο μηχανισμός αυτός απαντάται σε όλα τα μέλη του φυτικού και ζωικού βασιλείου. Στα κύτταρα των θηλαστικών ωστόσο, έχει αντικατασταθεί από άλλους πιο εξελιγμένους αμυντικούς μηχανισμούς. Η απόδειξη ότι το RNAi μπορεί να εφαρμοστεί και σε κύτταρα θηλαστικών έδωσε στους ερευνητές ένα πολύ σημαντικό εργαλείο με το οποίο μπορούν να διακόψουν την έκφραση ενός γονιδίου και έτσι να κατανοήσουν τον ρόλο του γονιδίου αυτού, καθώς και της πρωτεΐνης που αυτό εκφράζει.

Σε πειράματα *in vitro* η μεταφορά των miRNAs γίνεται με χρήση κατάλληλων φορέων όπως είναι η λιποφεκταμίνη. Η λιποφεκταμίνη είναι ένα πολυκατιονικό συνθετικό λιπίδιο που έχει αναμιχθεί με φωσφατίδυλο-αιθανολαμίνη. Όταν η λιποφεκταμίνη συνδυάζεται με νουκλεϊκά οξέα (π.χ. miRNAs) προκύπτει το λιπόσωμα. Τα λιπόσωμα έχουν την ιδιότητα λόγω της σύστασης τους, να διαπερνούν την κυτταρική μεμβράνη και να εναποθέτουν το νουκλεϊκό οξύ που φέρουν στο εσωτερικό του κυττάρου. Πριν την διαμόλυνση πρέπει απαραίτητα να προσδιοριστεί η κατάλληλη συγκέντρωση του miRNAs και της λιποφεκταμίνης που πρέπει να χορηγηθεί με σκοπό τη βέλτιστη αποσιώπηση των γονιδίων. Ο προσδιορισμός αυτός γίνεται μέσω μεταβολών χρησιμοποιούμενης συγκέντρωσης νουκλεϊκών οξέων και λιποφεκταμίνης.

#### **Πειραματική διαδικασία**

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής:

- ✓ Αποκόλληση των κυττάρων από τις φλάσκες με τη χρήση θρυψίνης, διαδικασία που προαναφέρθηκε παραπάνω. Ο αριθμός των κυττάρων που απομονώνεται από κάθε φλάσκα υπολογίζεται περίπου στις 1.200.000 κύτταρα.
- ✓ Μεταφορά κυττάρων σε πλάκα των 6 οπών και προσθήκη 2 ml θρεπτικού υλικού σε κάθε οπή (200.000/ οπή) και επώαση για 24 ώρες στον κλίβανο στους 37°C.
- ✓ Την επόμενη ημέρα κάθε οπή πρέπει να εμφανίζει πληρότητα σε κύτταρα 60-70% έτσι ώστε να μπορέσει να πραγματοποιηθεί η διαμόλυνση.
- ✓ Ανάμειξη 40 pmol mimic miRNA με θρεπτικό υλικό Opti-Mem 1 Reduced Serum Medium (Invitrogen).
- ✓ Ήπια ανάδευση.
- ✓ Ανάμειξη 40 pmol λιποφεκταμίνης με θρεπτικό υλικό Opti-Mem 1 Reduced Serum Medium (Invitrogen).
- ✓ Ήπια ανάδευση του διαλύματος και επώαση 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Ανάμειξη των δυο παραπάνω διαλυμάτων mimic miRNAs-λιποφεκταμίνης και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να γίνει το σύμπλοκο που θα μεταφερθεί στη συνέχεια στα κύτταρα.
- ✓ Μεταφορά συμπλόκου mimic miRNAs-λιποφεκταμίνης στα κύτταρα και καλή ανάδευση για τον ομοιογενή διασκορπισμό τους.
- ✓ Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο στους 37°C και αλλαγή θρεπτικού υλικού μετά από περίπου 6 ώρες και αντικατάσταση του από πλήρες θρεπτικό υλικό.
- ✓ Επώαση των κυττάρων στον κλίβανο στους 37°C για 72 ώρες και μάζεμα κυττάρων προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για απομόνωση RNA, με τη διαδικασία που αναφέρθηκε παραπάνω.

#### **B.1.9 Βιοπληροφορική ανάλυση γονιδίων-στόχων των miRNAs**

Για την εύρεση των γονιδίων-στόχων των miR0-140 και miR146a χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πρόγραμμα TargetScan. Με τη χρήση του προγράμματος PANTHER πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός των σηματοδοτικών μονοπατιών που συμμετέχουν τα γονίδια-στόχοι των υπό μελέτη miRNAs. Η

ανεύρεση των κοινών σηματοδοτικών μονοπατιών των miR-140 και miR-146a έγινε με το πρόγραμμα DrawVennDiagrams.

#### **B.1.10 Στατιστική ανάλυση**

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα SPSS 24 και αναλυτικότερα χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες δοκιμασίες: independent-samples T-test, Kruskal-Wallis, Mann-Whitney 2-tailed U-test και ANOVA (analysis of variance) με Tukey's Honestly Significant Different (HSD) ως post hoc test. Ως όριο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε η τιμή  $p < 0.05$ .



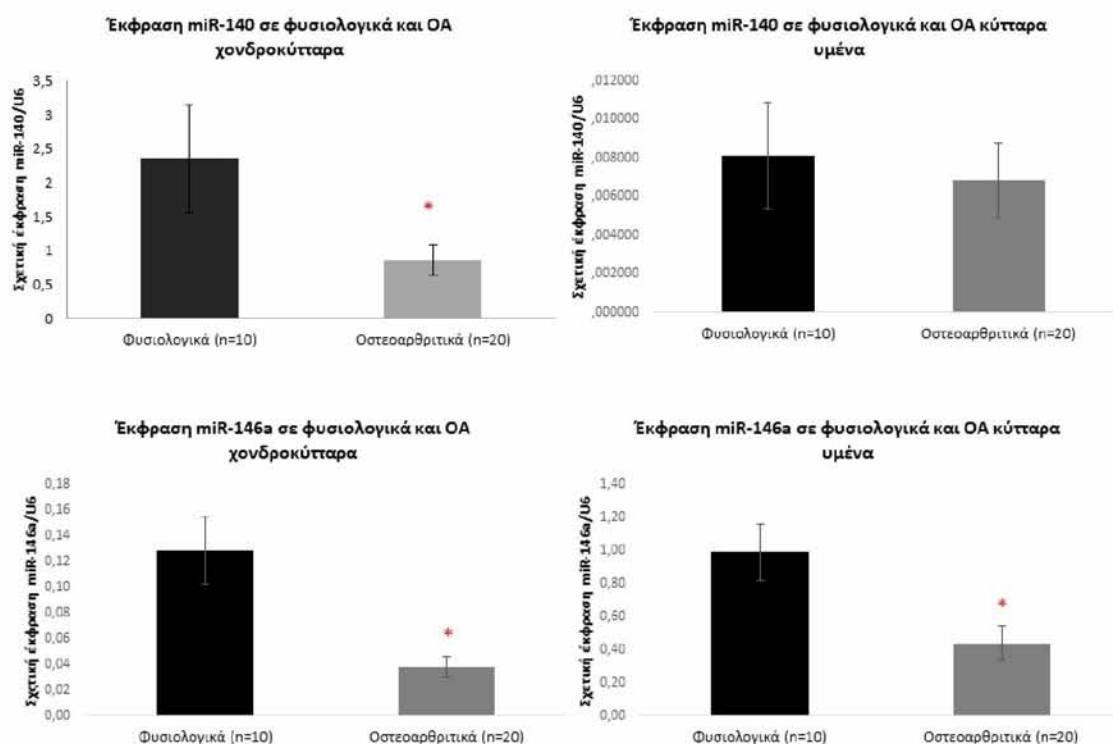
## B.2. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### B.2.1. Δείγματα αρθρικού χόνδρου

Στην παρούσα διπλωματική εργασία τα δείγματα αρθρικού χόνδρου ασθενών με ΟΑ γόνατος είχαν  $K/Lscore > 3$ , ενώ όλα τα δείγματα των φυσιολογικών αρθρικών χόνδρων είχαν  $K/Lscore = 0$ .

### B.2.2. Έκφραση του miR-140 και miR-146a σε φυσιολογικά και ΟΑ χονδροκύτταρα και κύτταρα υμένα.

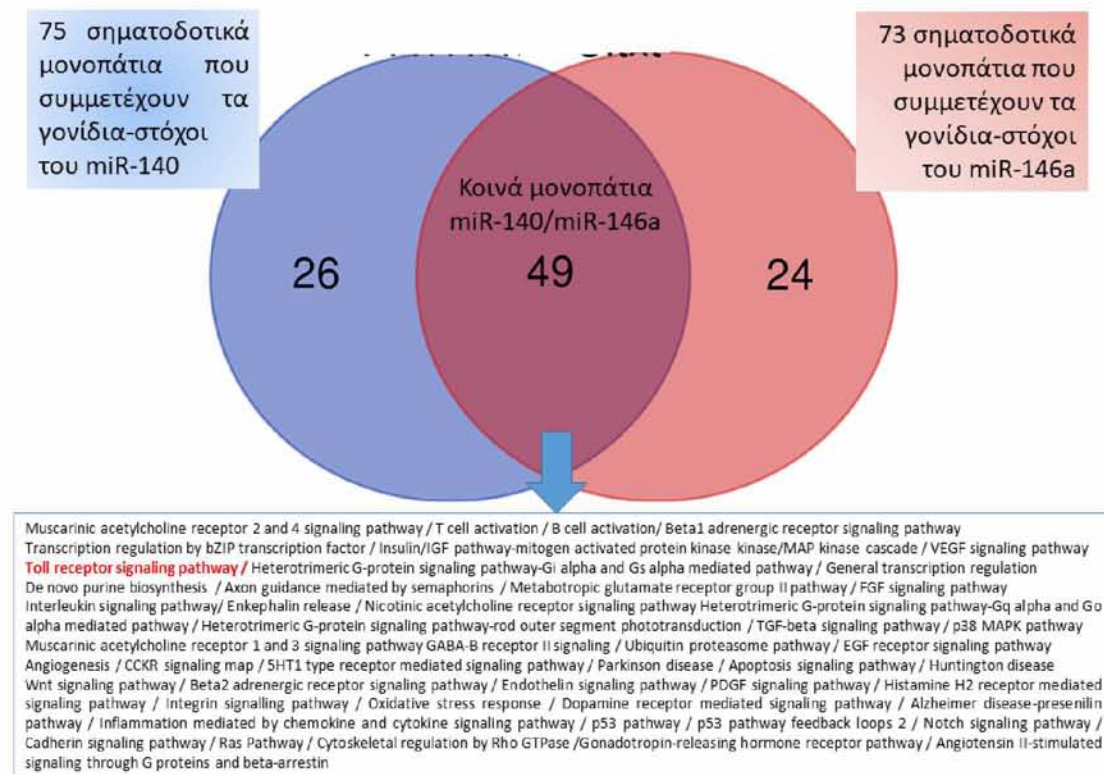
Προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος των miR-140 και miR-146a στην ΟΑ, αρχικά προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης τους σε ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα και κύτταρα υμένα με τη μέθοδο qRT-PCR. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της έκφρασης των ανωτέρω miRNAs έδειξε στατιστικά σημαντική μείωση της έκφρασης των miR-140 και miR-146a στα ΟΑ χονδροκύτταρα συγκριτικά με τα φυσιολογικά χονδροκύτταρα ( $p < 0.05$ ). Επίσης, μειωμένη έκφραση του miR-146a παρατηρήθηκε στα ΟΑ κύτταρα υμένα συγκριτικά με τα φυσιολογικά ( $p < 0.05$ ), ενώ η έκφραση του miR-140 δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά μεταξύ φυσιολογικών και ΟΑ κυττάρων υμένα.



**Εικόνα 12:** Απεικόνιση των επιπέδων mRNA των miR-140 και 146a σε καλλιέργειες φυσιολογικών και ΟΑ χονδροκυττάρων και κυττάρων υμένα. \* $p < 0.05$ .



σηματοδοτικά μονοπάτια, αντίστοιχα, εκ των οποίων τα 49 ήταν κοινά. Μεταξύ αυτών το σηματοδοτικό μονοπάτι του TLR-4, που ενέχεται στην εκδήλωση της ΟΑ, αποτελεί στόχο των miR-140 και miR-146a, μέσω της ρύθμισης της έκφρασης διαφορετικών μορίων που συμμετέχουν στο παραπάνω μονοπάτι.



**Εικόνα 13:** Απεικόνιση των κοινών σηματοδοτικών μονοπατιών των γονιδίων-στόχων του miR-140 και miR-146a με ViennaDiagram.

#### **B.2.4. Έκφραση μεταγραφικών επιπέδων της ADAMTS-5 και του TLR-4 μετά από χορήγηση miR-140mimic σε κυτταροκαλλιέργειες ΟΑ χονδροκυττάρων.**

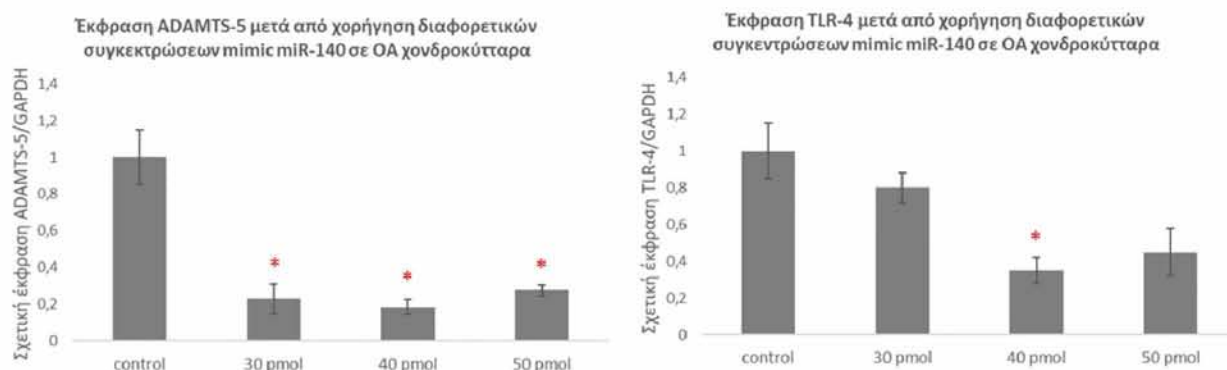
Αρχικά, χορηγήθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις miR-140mimic (5pmol, 10pmol, 15pmol, 30pmol, 40pmol, 50pmol) σε ΟΑ χονδροκύτταρα και υπολογίσθηκαν τα επίπεδα έκφρασης του miR-140 με qRT-PCR προκειμένου να προσδιοριστεί η καλύτερη δυνατή συγκέντρωση δράσης του miR-140mimic. Η μεγαλύτερη αύξηση της έκφρασης του miR-140 σημειώθηκε στις συγκεντρώσεις 30pmol, 40pmol και 50pmol, με τη μέγιστη αύξηση να παρατηρείται στα ΟΑ χονδροκύτταρα που διαμολύνθηκαν με 40pmol miR-140mimic.





**Εικόνα 14:** Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του miR-140 μετά από χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων miR-140 mimic σε OA χονδροκύτταρα

Στη συνέχεια, προκειμένου να μελετηθεί σε κυτταρικό επίπεδο η άμεση ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης της ADAMTS-5 και του TLR-4 από το miR-140, ακολούθησε ο προσδιορισμός των μεταγραφικών επιπέδων των ανωτέρω γονιδίων-στόχων μετά τη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων miR-140 (30, 40 και 50 pmol) σε καλλιέργειες OA χονδροκυττάρων για 72 ώρες. Παρατηρήθηκε, στατιστικά σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων της ADAMTS-5 στα OA χονδροκύτταρα που υπέστησαν επίδραση με miR-140, συγκριτικά με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε miR-140 ( $p < 0.05$ ), με τη μεγαλύτερη μείωση να παρατηρείται στα OA χονδροκύτταρα που τους χορηγήθηκε 40 pmol miR-140 mimic. Όσον αφορά στην έκφραση του TLR-4 παρατηρήθηκε μείωση των μεταγραφικών του επιπέδων στα OA χονδροκύτταρα που υπέστησαν επίδραση με 40 pmol miR-140 mimic, συγκριτικά με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε miR-140 ( $p < 0.05$ ).



**Εικόνα 15:** Απεικόνιση μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου ADAMTS-5 και TLR-4 μετά από χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων miR-140mimic σε OA χονδροκύτταρα.

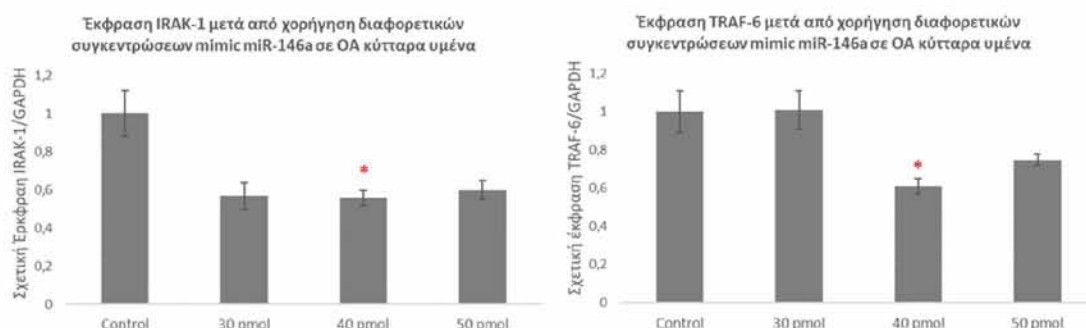
#### **B.2.5. Έκφραση μεταγραφικών επιπέδων της IRAK-1 και της TRAF-6 μετά από χορήγηση miR-146a mimic σε κυτταροκαλλιέργειες OA κυττάρων υμένα.**

Σε κυτταροκαλλιέργειες OA κυττάρων υμένα χορηγήθηκαν αυξανόμενες συγκεντρώσεις miR-146a (5 pmol, 10 pmol, 15 pmol, 30 pmol, 40 pmol, 50 pmol) για να προσδιοριστεί η καλύτερη δυνατή συγκέντρωση δράσης του miR-146a mimic. Ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης του miR-146a με qRT-PCR επιβεβαίωσε την είσοδο του miR-146a mimic στα OA κύτταρα υμένα με τη μεγαλύτερη αύξηση της έκφρασης του miR-146a παρατηρείται στις συγκεντρώσεις 30 pmol, 40 pmol και 50 pmol. Η μέγιστη αύξηση της έκφρασης του miR-146a παρατηρήθηκε στα OA κύτταρα υμένα που διαμολύνθηκαν με 40 pmol miR-146a mimic.



**Εικόνα 16:** Απεικόνιση των επιπέδων έκφρασης του miR-146a μετά από χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων miR-146a mimic σε OA κύτταρα υμένα

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης εύρεσης των γονιδίων-στόχων του miR-146a, ακολούθησε ποσοτικός προσδιορισμός των μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων IRAK-1 και TRAF-6 μετά τη χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων αυξανόμενων συγκεντρώσεων miR-146a (30, 40 και 50 pmol) σε καλλιέργειες OA κυττάρων υμένα για 72 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν στατιστικά σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων της IRAK-1 και TRAF-6 στα OA κύτταρα υμένα που υπέστησαν επίδραση με 40 pmol miR-146a mimic, συγκριτικά με αυτά που δεν τους χορηγήθηκε ( $p < 0.05$ ). Δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική μείωση των μεταγραφικών επιπέδων της IRAK-1 και TRAF-6 μετά από χορήγηση 30 και 50 pmol miR-146a mimic στα OA κύτταρα υμένα.



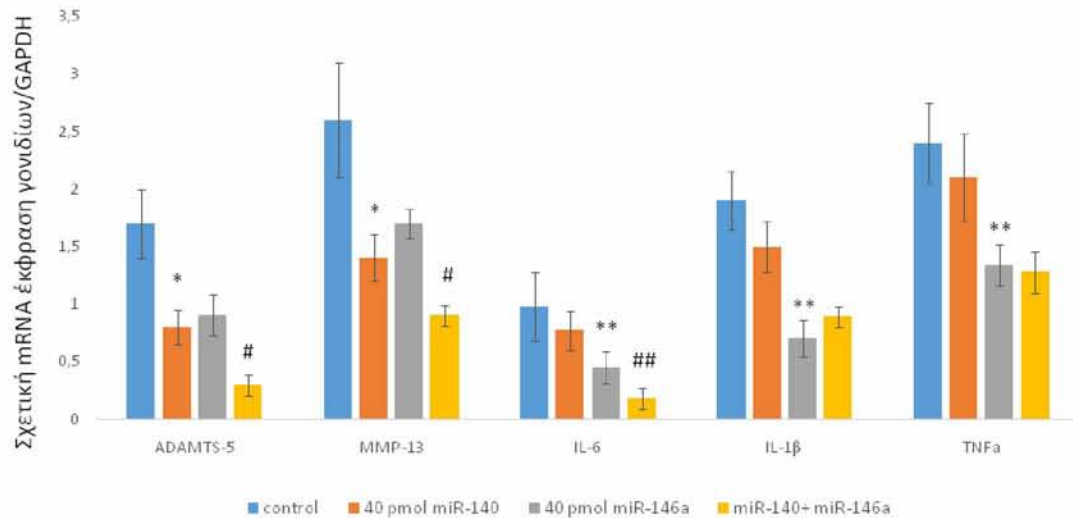
**Εικόνα 17:** Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων IRAK-1 και TRAF-6 μετά από χορήγηση αυξανόμενων συγκεντρώσεων miR-146a mimic σε OA κύτταρα υμένα

**B.2.6. Έκφραση μεταγραφικών επιπέδων των γονιδίων ADAMTS-5, MMP-13, IL-6, IL-1β και TNFα μετά από χορήγηση miR-140 και/ ή miR-146a mimic σε OA χονδροκύτταρα και κύτταρα υμένα.**

Δεδομένου ότι το miR-140 ρυθμίζει την έκφραση του TLR-4 και το miR-146a την έκφραση των γονιδίων IRAK-1 και TRAF-6, μόρια που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TLR-4/NF-κB, ακολούθησε προσδιορισμός της έκφρασης μορίων, χαρακτηριστικών της OA, που επάγονται μετά την ενεργοποίηση του ανωτέρου σηματοδοτικού μονοπατιού. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν τα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων ADAMTS-5, MMP-13, IL-6, IL-1β και TNFα μετά από χορήγηση miR-140 ή miR-146a mimic αλλά και μετά από ταυτόχρονη συγχορήγηση miR-140 και miR-146a mimic σε OA χονδροκύτταρα και κύτταρα υμένα. Στατιστικά σημαντική μείωση παρατηρήθηκε στα μεταγραφικά επίπεδα των γονιδίων ADAMTS-5 και MMP-13 τόσο σε OA χονδροκύτταρα όσο και σε κύτταρα υμένα μετά τη χορήγηση miR-140 mimic, με περαιτέρω μείωση των ανωτέρω γονιδίων να παρατηρείται μόνο στα OA χονδροκύτταρα στα οποία πραγματοποιήθηκε συγχορήγηση με miR-146a mimic. Τα επίπεδα mRNA των φλεγμονωδών παραγόντων, IL-1β, IL-6 και TNFα μειώθηκαν στα OA χονδροκύτταρα και κύτταρα υμένα μετά τη χορήγηση miR-146a mimic. Η συγχορήγηση miR-140 και miR-146a mimic επέφερε επιπλέον μείωση στα μεταγραφικά επίπεδα της IL-6 στα OA χονδροκύτταρα και κύτταρα υμένα, ενώ τα επίπεδα mRNA της IL-1β μειώθηκαν μόνο στα OA κύτταρα υμένα.

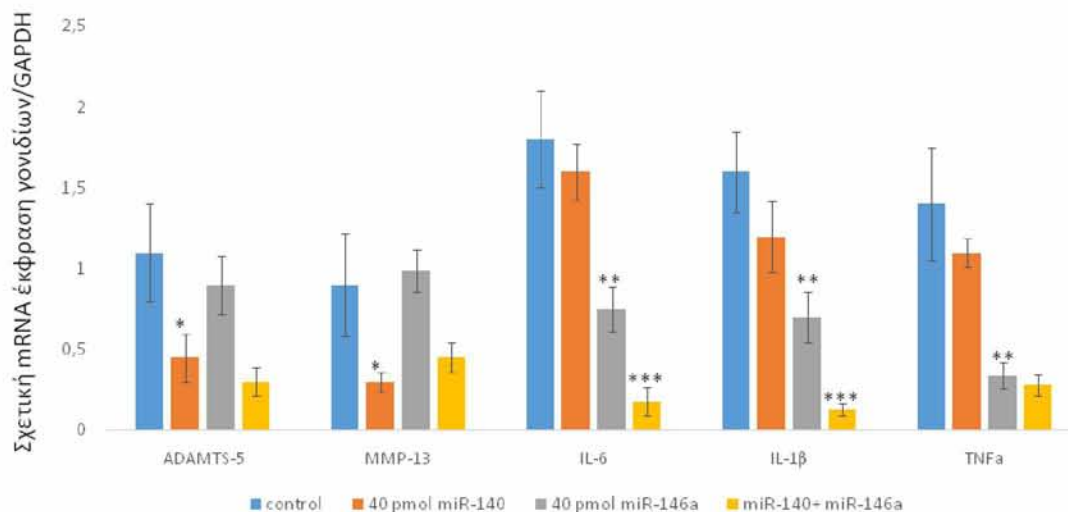


**Έκφραση ADAMTS-5, MMP-13, IL-6, IL-1β και TNFα μετά από χορήγηση mimic miR-140 ή/και miR-146a σε OA χονδροκύτταρα**



\*: control vs miR-140,  
 \*\*: control vs miR-146a,  
 # miR-140 vs miR-140+146a,  
 ## miR-146a vs miR-140+146a

**Έκφραση ADAMTS-5, MMP-13, IL-6, IL-1β και TNFα μετά από χορήγηση mimic miR-140 ή/και miR-146a σε OA κύτταρα υμένα**



\*: control vs miR-140,  
 \*\*: control vs miR-146a,  
 \*\*\*: miR-146a vs miR-140+146a

**Εικόνα 18:** Απεικόνιση των μεταγραφικών επιπέδων έκφρασης των γονιδίων ADAMTS-5, MMP-13, IL-6, IL-1β και TNFα μετά από χορήγηση miR-140 και/ή miR-146a mimic σε OA χονδροκύτταρα και κύτταρα υμένα

### B.3 Συζήτηση

Η ΟΑ ή εκφυλιστική νόσος των αρθρώσεων χαρακτηρίζεται ως ασθένεια όλων των δομών της άρθρωσης, δηλαδή του αρθρικού χόνδρου, του αρθρικού υμένα και του υποχόνδριου οστού (Anon n.d.). Μια ΟΑ άρθρωση χαρακτηρίζεται κυρίως από σταδιακή εκφύλιση του αρθρικού χόνδρου, στένωση του αρθρικού διαστήματος και φλεγμονή του αρθρικού υμένα (Gu et al. 2017) (Goldring and Goldring n.d.). Η ΟΑ θεωρείται πολυπαραγοντική νόσος καθώς ένας συνδυασμός γενετικών, επιγενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων συμβάλουν στην ανάπτυξη και εξέλιξη της νόσου (Goldring and Goldring n.d.).

Τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει στραφεί στη διερεύνηση του ρόλου των επιγενετικών μηχανισμών στην αιτιοπαθογένεια πολυπαραγοντικών νόσων, όπως η ΟΑ. Οι κυριότεροι επιγενετικοί μηχανισμοί, οι οποίοι έχουν μελετηθεί για την πιθανή συμμετοχή τους στην παθογένεια της ΟΑ είναι η μεθυλίωση του DNA, οι τροποποιήσεις των ιστονών και τα miRNAs (Genemaras et al. 2016).

Τα miRNAs συμμετέχουν στη φυσιολογική ανάπτυξη και λειτουργία του αρθρικού χόνδρου, με αποτέλεσμα όταν απορρυθμίζεται η λειτουργικότητά τους να συμβάλλουν στην αποδόμηση του και κατ' επέκταση στην εκδήλωση της ΟΑ. Στη συγκεκριμένη μελέτη αρχικά προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης δύο miRNAs, του miR-140 και miR-146a σε ΟΑ και φυσιολογικά χονδροκύτταρα και κύτταρα υμένα, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος τους στην αιτιοπαθογένεια της νόσου. Στα ΟΑ χονδροκύτταρα παρατηρήθηκε μειωμένη έκφραση του miR-140 και του miR-146a σε σχέση με τα φυσιολογικά, ενώ στα ΟΑ κύτταρα υμένα σημειώθηκε μείωση μόνο στο miR-146a σε σχέση με τα φυσιολογικά. Το miR-140 ήταν από τα πρώτα miRNAs τα οποία μελετήθηκαν για την πιθανή συμμετοχή τους στην ΟΑ, καθώς εκφράζεται ιστοειδικά στον χόνδρο, ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη διατήρηση της ομοιόστασης της άρθρωσης και παρουσιάζει διαφοροποιημένη έκφραση στον ΟΑ χόνδρο σε σχέση με το φυσιολογικό (Tommie C. Simon and Jeffries 2017) (Miyaki et al. 2010b). Όσον αφορά το miR-146a βιβλιογραφικά δεδομένα συσχετίζουν τα επίπεδα έκφρασης του miR-146a με το βαθμό αλλοίωσης του αρθρικού χόνδρου. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μια αντιστρόφως ανάλογη σχέση καθώς η έκφραση του miR-146a μειώνεται όσο εξελίσσεται η νόσος (Wang Y A et al. 2013).

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της διαφοροποιημένης έκφρασης των miR-140 και miR-146a στους ΟΑ ιστούς σε σχέση με τους φυσιολογικούς,

πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων-στόχων των ανωτέρω miRNAs αλλά και μονοπατιών που συμμετέχουν τα γονίδια-στόχοι, προκειμένου να διερευνηθεί ο ρόλος τους στην ΟΑ. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως τα δύο miRNAs ρυθμίζουν την έκφραση μορίων που συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TLR-4, το οποίο ενέχεται στην αιτιοπαθογένεια της νόσου. Συγκεκριμένα το miR-140 ρυθμίζει την έκφραση του TLR-4 και το miR-146a την έκφραση των γονιδίων IRAK-1 και TRAF-6. Επιπλέον το miR-140 ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου ADAMTS-5, ενός πρωτεολυτικού ενζύμου που διαδραματίζει κύριο ρόλο στην αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας του αρθρικού χόνδρου.

Προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της βιοπληροφορικής ανάλυσης σε κυτταρικό επίπεδο, πραγματοποιήθηκε χορήγηση miR-140 και miR-146a mimic σε ΟΑ χονδροκύτταρα και κύτταρα υμένα, αντίστοιχα, και προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων-στόχων. Στα ΟΑ χονδροκύτταρα παρατηρήθηκε μείωση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων-στόχων ADAMTS-5 και TLR-4, μετά την αύξηση των επιπέδων του miR-140 μέσω της χορήγησης miR-140 mimic, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης. Προηγούμενες μελέτες συσχετίζουν τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης της ADAMTS-5 με τα μειωμένα επίπεδα του miR-140, αναδεικνύοντας το ρόλο της μειωμένης έκφρασης του miR-140 στον εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου. (Miyaki et al. 2010a)(Zhang et al. 2013)(Verma and Dalal 2011)(Tommie C. Simon and Jeffries 2017). Επίσης, μια πρόσφατη μελέτη απέδειξε πως το miR-140 εκτός της συμμετοχής του στην αποδόμηση της εξωκυττάριας ουσίας μέσω της ρύθμισης της έκφρασης καταβολικών ενζύμων, παίζει ρόλο και στην επαγωγή της φλεγμονής εντός της ΟΑ άρθρωσης καθώς καταστείλει την έκφραση του TLR-4 υποδοχέα, ο οποίος επάγει την έκφραση φλεγμονωδών παραγόντων συμπεριλαμβανομένων της IL-1b, IL-6, IL-8 και του TNF-a μέσω της ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα NF-kB(Zhang and Shao 2018).

Όσον αφορά στο ρόλο του miR-146a στην παθογένεια της νόσου, παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της έκφρασης του miR-146a σε ΟΑ κύτταρα υμένα μέσω της χορήγησης miR-146a mimic, επέφερε μείωση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων IRAK-1 και TRAF-6 αναδεικνύοντας το ρόλο του miR-146a στις διαδικασίες της φλεγμονής που πραγματοποιούνται σε μια ΟΑ άρθρωση.

Τα μόρια IRAK-1 και TRAF-6, στόχοι του miR-146a συμμετέχουν στο μονοπάτι σηματοδότησης που ενεργοποιεί τον μεταγραφικό παράγοντα NF-kB, ο οποίος όπως αναφέρθηκε προηγουμένως επάγει την παραγωγή φλεγμονωδών

παραγόντων(Wang Y A et al. 2013). Η μειωμένη έκφραση του miR-146απου παρατηρήθηκε στους OA ιστούς μπορεί να συσχετιστεί με την έντονη φλεγμονή που παρατηρείται στη νόσο, καθώς αυξάνονται τα επίπεδα των IRAK-1 και TRAF-6, ενισχύοντας περαιτέρω την παραγωγή φλεγμονωδών μεσολαβητών τόσο από τον αρθρικό χόνδρο όσο και από τον υμένα.

Η ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού του TLR-4 συμβάλλει στην εξέλιξη της νόσου μέσω της επαγωγής της έκφρασης καταβολικών ενζύμων και φλεγμονωδών παραγόντων(Liu-Bryan and Terkeltaub 2010)(Olivotto et al. 2015)Βασιζόμενοι στα παραπάνω αποτέλεσμα πως το miR-140 και miR-146αστοχεύουν σε μόρια που συμμετέχουν στο μονοπάτι του TLR-4, ρυθμίζοντας την ενεργοποίηση του, προσδιορίστηκαν τα επίπεδα έκφρασης των καταβολικών ενζύμων ADAMTS-5 και MMP-13, καθώς και των φλεγμονωδών παραγόντων, IL-1β, IL-6, και TNF-αμετά από συγχρόνηση των δύο miRNAsσε OA χονδροκύτταρα και κύτταρα υμένα. Τα αποτελέσματα έδειξαν περαιτέρω μείωση της ADAMTS-5, της MMP-13, της IL-1β και της IL-6 σε OA χονδροκύτταρα ή κύτταρα υμένα που υπέστησαν συγχρόνηση των miRNAs, σε σχέση με τη μείωση που παρατηρήθηκε σε OA χονδροκύτταρα ή κύτταρα υμένα που τους χορηγήθηκε είτε miR-140 είτε miR-146a, προτείνοντας τη συνεργιστική δράση των miR-140 και miR-146a στην αιτιοπαθογένεια της νόσου. Η μεγάλη μείωση των ανωτέρω γονιδίων μετά τη συγχρόνηση τωνmiR-140 και miR-146αμπορεί να οφείλεται στην καταστολή της ενεργοποίησης του μονοπατιού του TLR-4, μέσω του οποίου επάγεται η έκφραση των ανωτέρω καταβολικών ενζύμων και ιντερλευκινών, καθώς βάσει των αποτελεσμάτων της βιοπληροφορικής ανάλυσης τα ανωτέρω γονίδια δεν αποτελούν κοινούς στόχους των δύο miRNAs.

Συμπερασματικά, στην παρούσα διπλωματική εργασία αναδείχτηκε ο ρόλος τωνmiR-140 και miR-146αστην αιτιοπαθογένεια της νόσου μέσω της ρύθμισης του σηματοδοτικού μονοπατιού του TLR-4 που επάγει διαδικασίες φλεγμονής και καταβολισμού του χόνδρου. Η αύξηση της έκφρασης των miR-140 και miR-146α στους OA ιστούς, τα επίπεδα των οποίων είναι μειωμένα, μπορεί να καταστέλλει την ενεργοποίηση του TLR-4 και κατ' επέκταση την παραγωγή καταβολικών ενζύμων και φλεγμονωδών παραγόντων που οδηγούν στο σταδιακό εκφυλισμό του αρθρικού χόνδρου. Ωστόσο, περαιτέρω *invitro* και *invivo* μελέτες απαιτούνται για την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων το miR-140 και το miR-

146a συμβάλλουν στην έναρξη και εξέλιξη της νόσου, δημιουργώντας νέες προοπτικές για τη διάγνωση και τη θεραπεία ασθενών με ΟΑ.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Aigner, T. and L. McKenna. 2002. "Molecular Pathology and Pathobiology of Osteoarthritic Cartilage." *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 59(1):5–18.
2. Anderson, J. J. and D. T. Felson. 1988. "Factors Associated with Osteoarthritis of the Knee in the First National Health and Nutrition Examination Survey (HANES I). Evidence for an Association with Overweight, Race, and Physical Demands of Work." *American Journal of Epidemiology* 128(1):179–89.
3. Andrianakos, Alexandros A. et al. 2006b. "Prevalence of Symptomatic Knee, Hand, and Hip Osteoarthritis in Greece. The ESORDIG Study." *The Journal of Rheumatology* 33(12):2507–13.
4. Anon. n.d. "Aginko Research AG." Retrieved August 22, 2018 (<https://www.aginko.com/>).
5. Araldi, Elisa and Ernestina Schipani. 2010. "MicroRNA-140 and the Silencing of Osteoarthritis." *Genes & Development* 24(11):1075–80.
6. Baker, Joseph F., Pauline Walsh, and Kevin J. Mulhall. 2011. "Statins: A Potential Role in the Management of Osteoarthritis?" *Joint, Bone, Spine : Revue Du Rhumatisme* 78(1):31–34.
7. Bian, Weiguo et al. 2016. "Morphological Characteristics of Cartilage-Bone Transitional Structures in the Human Knee Joint and CAD Design of an Osteochondral Scaffold." *Biomedical Engineering Online* 15(1):82.
8. Buckwalter, Joseph A., Henry J. Mankin, and Alan J. Grodzinsky. 2005. "Articular Cartilage and Osteoarthritis." *Instructional Course Lectures* 54:465–80.
9. Carrió, Elvira and Mònica Suelves. 2015. "DNA Methylation Dynamics in

- Muscle Development and Disease.” *Frontiers in Aging Neuroscience* 7:19.
10. CHANG, ZHIQIANG, LIFENG HUO, PENGFEI LI, YIMIN WU, and PEI ZHANG. 2015. “Ascorbic Acid Provides Protection for Human Chondrocytes against Oxidative Stress.” *Molecular Medicine Reports* 12(5):7086–92.
  11. Chubinskaya, S., K. E. Kuettner, and A. A. Cole. 1999. “Expression of Matrix Metalloproteinases in Normal and Damaged Articular Cartilage from Human Knee and Ankle Joints.” *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 79(12):1669–77.
  12. Collins, Kelsey H. et al. 2018. “Obesity, Metabolic Syndrome, and Musculoskeletal Disease: Common Inflammatory Pathways Suggest a Central Role for Loss of Muscle Integrity.” *Frontiers in Physiology* 9:112.
  13. Croft, P., D. Coggon, M. Cruddas, and C. Cooper. 1992. “Osteoarthritis of the Hip: An Occupational Disease in Farmers.” *BMJ (Clinical Research Ed.)* 304(6837):1269–72.
  14. Cucchiarini, Magali et al. 2016. “Basic Science of Osteoarthritis.” *Journal of Experimental Orthopaedics* 3(1):22.
  15. Felson, D. T. et al. 2000. “Osteoarthritis: New Insights. Part 1: The Disease and Its Risk Factors.” *Annals of Internal Medicine* 133(8):635–46.
  16. Felson, D. T. and Y. Zhang. 1998. “An Update on the Epidemiology of Knee and Hip Osteoarthritis with a View to Prevention.” *Arthritis and Rheumatism* 41(8):1343–55.
  17. Felson, David T. 2006. “Clinical Practice. Osteoarthritis of the Knee.” *The New England Journal of Medicine* 354(8):841–48.
  18. Felson, David T. 2009. “Developments in the Clinical Understanding of Osteoarthritis.” *Arthritis Research & Therapy* 11(1):203.



19. Fernandes, Julio C., Johanne Martel-Pelletier, and Jean-Pierre Pelletier. 2002. "The Role of Cytokines in Osteoarthritis Pathophysiology." *Biorheology* 39(1-2):237-46.
20. Gao, Yue et al. 2014. "The ECM-Cell Interaction of Cartilage Extracellular Matrix on Chondrocytes." *BioMed Research International* 2014:648459.
21. Garvican, Elaine R., Anne Vaughan-Thomas, John F. Innes, and Peter D. Clegg. 2010. "Biomarkers of Cartilage Turnover. Part 1: Markers of Collagen Degradation and Synthesis." *The Veterinary Journal* 185(1):36-42.
22. Genemaras, Amaris A., Hayley Ennis, Lee Kaplan, and Chun-Yuh Huang. 2016. "Inflammatory Cytokines Induce Specific Time- and Concentration-Dependent MicroRNA Release by Chondrocytes, Synoviocytes, and Meniscus Cells." *Journal of Orthopaedic Research* 34(5):779-90.
23. Goldring, Mary B. and Steven R. Goldring. 2007. "Osteoarthritis." *Journal of Cellular Physiology* 213(3):626-34.
24. Goldring, S. R. and M. B. Goldring. n.d. "Clinical Aspects, Pathology and Pathophysiology of Osteoarthritis." *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions* 6(4):376-78.
25. Gu, Yun-Tao et al. 2017. "Research Progress on Osteoarthritis Treatment Mechanisms." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 93:1246-52.
26. Guilak, Farshid, Robert J. Nims, Amanda Dicks, Chia-Lung Wu, and Ingrid Meulenbelt. 2018. "Osteoarthritis as a Disease of the Cartilage Pericellular Matrix." *Matrix Biology*.
27. Heinegård, Dick and Tore Saxne. 2011. "The Role of the Cartilage Matrix in Osteoarthritis." *Nature Reviews Rheumatology* 7(1):50-56.
28. Hellewell, Andrew L. and Josephine C. Adams. 2016. "Insider Trading:

Extracellular Matrix Proteins and Their Non-Canonical Intracellular Roles.” *BioEssays* 38(1):77–88.

29. Iliopoulos, Dimitrios, Konstantinos N. Malizos, Pagona Oikonomou, and Aspasia Tsezou. 2008. “Integrative MicroRNA and Proteomic Approaches Identify Novel Osteoarthritis Genes and Their Collaborative Metabolic and Inflammatory Networks.” *PloS One* 3(11):e3740.
30. Ishiguro, Naoki, Toshihisa Kojima, and A. Robin Poole. 2002. “Mechanism of Cartilage Destruction in Osteoarthritis.” *Nagoya Journal of Medical Science* 65(3–4):73–84.
31. Jones, S. W. et al. 2009. “The Identification of Differentially Expressed MicroRNA in Osteoarthritic Tissue That Modulate the Production of TNF- $\alpha$  and MMP13.” *Osteoarthritis and Cartilage* 17(4):464–72.
32. Lane, Nancy E. et al. 2000. “Association of Mild Acetabular Dysplasia with an Increased Risk of Incident Hip Osteoarthritis in Elderly White Women: The Study of Osteoporotic Fractures.” *Arthritis & Rheumatism* 43(2):400.
33. Lawrence, R. C. et al. 1989a. “Estimates of the Prevalence of Selected Arthritic and Musculoskeletal Diseases in the United States.” *The Journal of Rheumatology* 16(4):427–41.
34. Le, Linh T. T., Tracey E. Swingle, and Ian M. Clark. 2013. “Review: The Role of MicroRNAs in Osteoarthritis and Chondrogenesis.” *Arthritis and Rheumatism* 65(8):1963–74.
35. Li, Heng, Dan Wang, Yongjian Yuan, and Jikang Min. 2017. “New Insights on the MMP-13 Regulatory Network in the Pathogenesis of Early Osteoarthritis.” *Arthritis Research & Therapy* 19(1):248.
36. Li, Xin et al. 2011. “MicroRNA-146a Is Linked to Pain-Related Pathophysiology of Osteoarthritis.” *Gene* 480(1–2):34–41.

37. Liang, Zu-jian et al. 2012. "MiRNA-140 Is a Negative Feedback Regulator of MMP-13 in IL-1 $\beta$ -Stimulated Human Articular Chondrocyte C28/I2 Cells." *Inflammation Research* 61(5):503–9.
38. Liu-Bryan, Ru and Robert Terkeltaub. 2010. "Chondrocyte Innate Immune MyD88-Dependent Signaling Drives pro-Catabolic Effects of the Endogenous TLR2/TLR4 Ligands LMW-HA and HMGB1." *Arthritis & Rheumatism* 62(7):n/a-n/a.
39. Lu, Pengfei, Ken Takai, Valerie M. Weaver, and Zena Werb. 2011. "Extracellular Matrix Degradation and Remodeling in Development and Disease." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3(12).
40. Ma, Tian-Wen et al. 2017. "Changes in Synovial Fluid Biomarkers after Experimental Equine Osteoarthritis." *Journal of Veterinary Research* 61(4):503–8.
41. Macfarlane, Leigh-Ann and Paul R. Murphy. 2010. "MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer." *Current Genomics* 11(7):537–61.
42. Martel-Pelletier, Johanne. 2004. "Pathophysiology of Osteoarthritis." *Osteoarthritis and Cartilage* 12 Suppl A:S31-3.
43. Martel-Pelletier, Johanne, Christelle Boileau, Jean-Pierre Pelletier, and Peter J. Roughley. 2008. "Cartilage in Normal and Osteoarthritis Conditions." *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 22(2):351–84.
44. Mathiessen, Alexander and Philip G. Conaghan. 2017. "Synovitis in Osteoarthritis: Current Understanding with Therapeutic Implications." *Arthritis Research & Therapy* 19(1):18.
45. McAlindon, T. E. et al. 1996. "Relation of Dietary Intake and Serum Levels of Vitamin D to Progression of Osteoarthritis of the Knee among Participants in

- the Framingham Study.” *Annals of Internal Medicine* 125(5):353–59.
46. Mirzamohammadi, Fatemeh, Garyfallia Papaioannou, and Tatsuya Kobayashi. 2014. “MicroRNAs in Cartilage Development, Homeostasis, and Disease.” *Current Osteoporosis Reports* 12(4):410–19.
  47. Miyaki, Shigeru et al. 2010a. “MicroRNA-140 Plays Dual Roles in Both Cartilage Development and Homeostasis.” *Genes & Development* 24(11):1173–85.
  48. Miyaki, Shigeru et al. 2010b. “MicroRNA-140 Plays Dual Roles in Both Cartilage Development and Homeostasis.” *Genes & Development* 24(11):1173–85.
  49. Muttigi, Manjunatha, Inbo Han, Hun-Kuk Park, Hansoo Park, and Soo-Hong Lee. 2016. “Matrilin-3 Role in Cartilage Development and Osteoarthritis.” *International Journal of Molecular Sciences* 17(4):590.
  50. Myllyharju, J. and K. I. Kivirikko. 2001. “Collagens and Collagen-Related Diseases.” *Annals of Medicine* 33(1):7–21.
  51. Nielsen, Flemming K., Niels Egund, Anette Jørgensen, and Anne Grethe Jurik. 2017. “Risk Factors for Joint Replacement in Knee Osteoarthritis; a 15-Year Follow-up Study.” *BMC Musculoskeletal Disorders* 18(1):510.
  52. O’Brien, Jacob, Heyam Hayder, Yara Zayed, and Chun Peng. 2018. “Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation.” *Frontiers in Endocrinology* 9:402.
  53. Oliviero, F., R. Ramonda, and L. Punzi. 2010. “New Horizons in Osteoarthritis.” *Swiss Medical Weekly* 140:w13098.
  54. Olivotto, Eleonora, Miguel Otero, Kenneth B. Marcu, and Mary B. Goldring. 2015. “Pathophysiology of Osteoarthritis: Canonical NF-KB/IKK $\beta$ -Dependent

and Kinase-Independent Effects of IKK $\alpha$  in Cartilage Degradation and Chondrocyte Differentiation.” *RMD Open* 1(Suppl 1):e000061.

55. Peach, Chris A., Andrew J. Carr, and John Loughlin. 2005. “Recent Advances in the Genetic Investigation of Osteoarthritis.” *Trends in Molecular Medicine* 11(4):186–91.
56. Pelletier, Jean-Pierre, Johanne Martel-Pelletier, and Steven B. Abramson. 2001. *Osteoarthritis, an Inflammatory Disease Potential Implication for the Selection of New Therapeutic Targets*. Vol. 44.
57. Pereira, D. et al. 2011. “The Effect of Osteoarthritis Definition on Prevalence and Incidence Estimates: A Systematic Review.” *Osteoarthritis and Cartilage* 19(11):1270–85.
58. Pick, Horst, Sinan Kilic, and Beat Fierz. 2014. “Engineering Chromatin States: Chemical and Synthetic Biology Approaches to Investigate Histone Modification Function.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1839(8):644–56.
59. Pitsillides, Andrew A. and Frank Beier. 2011. “Cartilage Biology in Osteoarthritis—lessons from Developmental Biology.” *Nature Reviews Rheumatology* 7(11):654–63.
60. Poole, A. R. et al. 2002. “Type II Collagen Degradation and Its Regulation in Articular Cartilage in Osteoarthritis.” *Annals of the Rheumatic Diseases* 61 Suppl 2(Suppl 2):ii78-81.
61. Poole, A. Robin et al. 2003. “Proteolysis of the Collagen Fibril in Osteoarthritis.” *Biochemical Society Symposium* (70):115–23.
62. Ripmeester, Ellen G. J., Ufuk Tan Timur, Marjolein M. J. Caron, and Tim J. M. Welting. 2018a. “Recent Insights into the Contribution of the Changing Hypertrophic Chondrocyte Phenotype in the Development and Progression of

- Osteoarthritis.” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 6:18.
63. Rizkalla, G., A. Reiner, E. Bogoch, and A. R. Poole. 1992. “Studies of the Articular Cartilage Proteoglycan Aggrecan in Health and Osteoarthritis. Evidence for Molecular Heterogeneity and Extensive Molecular Changes in Disease.” *The Journal of Clinical Investigation* 90(6):2268–77.
  64. Sandell, Linda J. and Thomas Aigner. 2001. “Articular Cartilage and Changes in Arthritis: Cell Biology of Osteoarthritis.” *Arthritis Research* 3(2):107.
  65. Sharma, L. 2016. “Osteoarthritis Year in Review 2015: Clinical.” *Osteoarthritis and Cartilage* 24(1):36–48.
  66. Simon, Tommie C. and Matlock A. Jeffries. 2017. “The Epigenomic Landscape in Osteoarthritis.” *Current Rheumatology Reports* 19(6):30.
  67. Smith, Gerald N. 2006. “The Role of Collagenolytic Matrix Metalloproteinases in the Loss of Articular Cartilage in Osteoarthritis.” *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 11:3081–95.
  68. Sokolove, Jeremy and Christin M. Lepus. 2013. “Role of Inflammation in the Pathogenesis of Osteoarthritis: Latest Findings and Interpretations.” *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 5(2):77–94.
  69. Sonkoly, Enikő and Andor Pivarcsi. 2009. “MicroRNAs in Inflammation.” *International Reviews of Immunology* 28(6):535–61.
  70. Sowers, M. 2001. “Epidemiology of Risk Factors for Osteoarthritis: Systemic Factors.” *Current Opinion in Rheumatology* 13(5):447–51.
  71. Spector, T. D., F. Cicuttini, J. Baker, J. Loughlin, and D. Hart. 1996. “Genetic Influences on Osteoarthritis in Women: A Twin Study.” *BMJ (Clinical Research Ed.)* 312(7036):940–43.

72. Taganov, K. D., M. P. Boldin, K. J. Chang, and D. Baltimore. 2006. "NF- B-Dependent Induction of MicroRNA MiR-146, an Inhibitor Targeted to Signaling Proteins of Innate Immune Responses." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(33):12481–86.
73. Tardif, Ginette, David Hum, Jean-Pierre Pelletier, Nicolas Duval, and Johanne Martel-Pelletier. 2009a. "Regulation of the IGFBP-5 and MMP-13 Genes by the MicroRNAs MiR-140 and MiR-27a in Human Osteoarthritic Chondrocytes." *BMC Musculoskeletal Disorders* 10(1):148.
74. Tchetina, Elena V. 2011. "Developmental Mechanisms in Articular Cartilage Degradation in Osteoarthritis." *Arthritis* 2011:1–16.
75. Tuddenham, Lee et al. 2006. "The Cartilage Specific MicroRNA-140 Targets Histone Deacetylase 4 in Mouse Cells." *FEBS Letters* 580(17):4214–17.
76. Umlauf, Daniel, Svetlana Frank, Thomas Pap, and Jessica Bertrand. 2010. "Cartilage Biology, Pathology, and Repair." *Cellular and Molecular Life Sciences* 67(24):4197–4211.
77. Verma, Priyanka and Krishna Dalal. 2011. "ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key Enzymes in Osteoarthritis." *Journal of Cellular Biochemistry* 112(12):3507–14.
78. Vornehm, S. I., J. Dudhia, K. von der Mark, and T. Aigner. 1996. "Expression of Collagen Types IX and XI and Other Major Cartilage Matrix Components by Human Fetal Chondrocytes in Vivo." *Matrix Biology* 15(2):91–98.
79. Wang, J. H., K. S. Shih, Y. W. Wu, A. W. Wang, and C. R. Yang. 2013. "Histone Deacetylase Inhibitors Increase MicroRNA-146a Expression and Enhance Negative Regulation of Interleukin-1 $\beta$  Signaling in Osteoarthritis Fibroblast-like Synoviocytes." *Osteoarthritis and Cartilage* 21(12):1987–96.
80. Wieland, Heike A., Martin Michaelis, Bernhard J. Kirschbaum, and Karl A. Rudolphi. 2005. "Osteoarthritis - an Untreatable Disease?" *Nature Reviews. Drug Discovery* 4(4):331–44.



81. Wilder, F. V., J. P. Barrett, and E. J. Farina. 2006. "Joint-Specific Prevalence of Osteoarthritis of the Hand." *Osteoarthritis and Cartilage* 14(9):953–57.
82. Wu, Chuanlong et al. 2014. "MicroRNAs Play a Role in Chondrogenesis and Osteoarthritis (Review)." *International Journal of Molecular Medicine* 34(1):1323.
83. Yamasaki, Keiichiro et al. 2009. "Expression of MicroRNA-146a in Osteoarthritis Cartilage." *Arthritis and Rheumatism* 60(4):1035–41.
84. Yamazaki, K. et al. 2003. "Cyclic Tensile Stretch Loaded on Bovine Chondrocytes Causes Depolymerization of Hyaluronan: Involvement of Reactive Oxygen Species." *Arthritis & Rheumatism* 48(11):3151–58.
85. Yang, Bo, Hongfeng Guo, Yulan Zhang, Shiwu Dong, and Dajun Ying. 2011. "The MicroRNA Expression Profiles of Mouse Mesenchymal Stem Cell during Chondrogenic Differentiation." *BMB Reports* 44(1):28–33.
86. Yu, Xiao-Ming et al. 2015. "MicroRNAs' Involvement in Osteoarthritis and the Prospects for Treatments." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : ECAM* 2015:236179.
87. Zhang, Rui, Jie Ma, and Jianfeng Yao. 2013. "Molecular Mechanisms of the Cartilage-Specific MicroRNA-140 in Osteoarthritis." *Inflammation Research : Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]* 62(10):871–77.
88. Zhang, Yun and Lingyun Shao. 2018. "Decreased MicroRNA-140-5p Contributes to Respiratory Syncytial Virus Disease through Targeting Toll-like Receptor 4." *Experimental and Therapeutic Medicine* 16(2):993–99.
89. Zhang, Yuqing and Joanne M. Jordan. 2010. "Epidemiology of Osteoarthritis." *Clinics in Geriatric Medicine* 26(3):355–69.

